Phytochemische Untersuchungen über Inhaltsstoffe von ERYSIMUM DECUMBENS Dennst., insbesondere der herzwirksamen Glykoside

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde des
Fachbereichs Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ursula Brambach
aus Neuenschleuse/Nieders.

Berlin 1976

Phytochemische Untersuchungen über Inhaltsstoffe von ERYSIMUM DECUMBENS Dennst., insbesondere der herzwirksamen Glykoside

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde des
Fachbereichs Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ursula Brambach
aus Neuenschleuse/Nieders.

Berlin 1976

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Referent : Professor Dr. R. Gmelin

Korreferent: Professor Dr. R. Hänsel

Tag der mündlichen Prüfung:

Tag der Promotion : 5. 11. 76

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmakognosie und Phytochemie der Freien Universität Berlin ausgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Rolf Gmelin für die großzügige Unterstützung und Förderung meiner Arbeit. Herzlich danken möchte ich Herrn Dr. A. Seeger von der Firma Schering A. G. für die Aufnahme und die zahlreichen, wertvollen Ratschläge bei der Diskussion der Spektren.

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	9
II.	BOTANISCHE MERKMALE VON ERYSIMUM DECUMBENS (SCHLEICHER EX WILLD.) DENNST.	
1.	Systematische Stellung der Brassicaceae und besondere Familienmerkmale	10
2.	Botanische Beschreibung der Art ERYSIMUM DECUMBENS Dennst. und geographische Verbreitung dieser Art	11
III.	CHARAKTERISTISCHE INHALTSSTOFFE DER GATTUNG ERYSIMUM	
1.	Glucosinolate	14
1.1.	Chemie der Glucosinolate	14
1.2.	Spezifische Glucosinolate der Gattung ERYSIMUM	15
1.3.	Glucosinolat-Vorkommen in den ERYSIMUM-Arten	18
2.	Cardenolide	22
2.1.	Chemie der Cardenolide	22
2.2.	Biosynthese der Cardenolide	24
2.3.	Cardenolide der Gattung ERYSIMUM	27
2.4.	Allgemeine Verbreitung von Cardenoliden in ERYSIMUM-Arten	33
IV.	BISHERIGE UNTERSUCHUNGEN VON ERYSIMUM DECUMBENS DENNST.	38
V.	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	
	HAUPTTEIL	
1.	Schematische Darstellung des Trennungsganges	39
2.	Analytische und präparative Chromatographie der Herzglykoside aus ERYSIMUM DECUMBENS Dennst.	41
3.	Substanz U3	45

3.1.	Isolierung der Substanz U3	45
3.2.	Identifizierung der Substanz U3	45
3.2.1.	Spektrometrische Methoden	45
3.2.2.	Strukturvorschlag für die Substanz U3	53
3.2.3.	Identifizierung von U3 als LOKUNDJOSID	53
3.2.4.	Spaltung der Substanz U3 nach Mannich und Siewert	55
3.2.5.	Identifizierung von U1 als BIPINDOGENIN durch Vergleich mit authentischem BIPINDOGENIN	55
4.	Substanz U2	57
4.1.	Isolierung der Substanz U2	57
4.2.	Charakterisierung der Substanz U2	57
4.2.1.	Spektrometrische Methoden	57
4.2.2.	Strukturvorschlag für die Substanz U2	65
4.2.3.	Acetylierung der Substanz U2	66
4.2.3.1.	Charakterisierung des O-Acetyl-derivates der Substanz U2	66
5.	Substanzen U4 und U5	68
5.1.	Isolierung der Substanzen U4 und U5	68
5.2.	Charakterisierung der Substanz U4	68
5.2.1.	Spaltung der Substanz U4	68
5.2.2.	Spektrometrische Methoden	69
5.2.3.	Acetylierung der Substanz U4	72
5.2.3.1.	Charakterisierung der acetylierten Substanz U4	73
5.3.	Charakterisierung der Substanz U5	75
5.3.1.	Spaltung der Substanz U5	75
5.3.2.	Spektrometrische Methoden	76
5.3.3.	Strukturvorschlag für die Substanz U5	76

VI.	EXPERIMENTELLER TEIL	
A.	Allgemeine Angaben	
1.	Chromatographie	78
2.	Sprühreagentien	78
3.	Elektrophorese	80
4.	Schmelzpunktbestimmungen	80
5.	Mikroanalysen	80
6.	UV-Spektrometrie	81
7.	IR-Spektrometrie	81
8.	^{1}H-NMR-Spektrometrie	81
9.	Massenspektren	81
10.	Optische Drehung	81
B.	Spezielle Angaben	
1.	Herkunft des Pflanzenmaterials	82
2.	Extraktion der Samen	82
3.	Isolierung eines Glucosinolats als Kalium-Salz	83
3.1.	Eigenschaften von Glucoiberin	83
4.	Isolierung der Substanzen U2 (16ß-Hydroxy-strophanthidol), U3 (Lokundjosid), U4 (Favargosid) und U5 (Gluco-Lokundjosid)	84
4.1.	Isolierung von U3	84
4.2.	Isolierung von U2, U3 aus U4, U5	85
4.3.	Isolierung von U4 und U5	87
4.4.	Eigenschaften von U2 (3ß,5ß,14ß,16ß,19-Pentahydroxy-card-20(22)-enolid)	87
4.4.1.	Acetylierung von U2	89
4.4.2.	Eigenschaften von U2-Penta-acetat	90
4.5.	Eigenschaften von U4 (3ß,5ß,14ß,16ß,19-Pentahydroxy-card-20(22)-enolid-3-ß-D-glucopyranosid)	90

4.5.1.	Acetylierung von U4	91
4.5.2.	Eigenschaften von U4-Hexa-acetat	92
4.5.3.	Spaltung von U4 mit Cellulase	93
4.6.	Eigenschaften von U3 (3ß,5ß,11α,14ß-Tetrahydroxy-card-20(22)-enolid-3-α-L-rhamnopyranosid)	94
4.6.1.	Spaltung von U3 nach Mannich und Siewert	96
4.6.2.	Eigenschaften von U1 (3ß,5ß,11α,14ß-Tetrahydroxy-card-20(22)-enolid)	97
4.6.3.	Vergleich von U1 mit Bipindogenin (MS)	98
4.7.	Eigenschaften von U5 (3ß,5ß,11α,14ß-Tetrahydroxy-card-20(22)-enolid-3ß-O-[O-ß-D-glucopyranosyl-(1 → 4)]-α-L-rhamnopyranosid)	98
4.7.1.	Spaltung von U5	99
VII.	Diskussion	101
VIII.	Zusammenfassung	103
IX.	Literaturverzeichnis	105
X.	Lebenslauf	115

I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Die an Arten und " Mischformen " so reiche Gattung ERYSIMUM, die nach JARETZKY (44) herzwirksame Vertreter aufweist, wurde von REICHSTEIN und Mitarbeitern (40,101) und in jüngster Zeit vor allem von Forschungsgruppen der UDSSR auf Cardenolide untersucht (1, 63, 77).

Diese Arbeiten ergaben, daß ERYSIMUM-Arten in allen Pflanzenteilen, besonders reichlich aber in den Samen, Cardenolide enthalten. Außerdem ist das Vorkommen bestimmter Glucosinolat-Typen und -Kombinationen für diese Gattung der Brassicaceen-Familie charakteristisch, wie GMELIN, KJAER und SCHULTZ zeigen konnten (19, 31, 35, 40).

ERYSIMUM DECUMBENS (Schleicher ex Willd.) Dennst. (= ERYSIMUM OCHROLEUCUM DC.) wurde 1964 von FAVARGER (22), Neuchâtel, botanisch neu bestimmt. Erste Untersuchungen der Samen von ERYSIMUM DECUMBENS Dennst. durch GMELIN und KJAER (35) ergaben zwei Glucosinolate (3-Methylthiopropylglucosinolat = GLUCOIBERVIRIN, und 3-Methylsulfinylpropylglucosinolat = GLUCOIBERIN), die bisher in dieser Gattung noch nicht gefunden worden waren.

Orientierende Voruntersuchungen in unserem Institut haben ergeben, daß die Samen von ERYSIMUM DECUMBENS Dennst. ebenfalls Cardenolide enthalten, die sich jedoch chemisch von den bisher bekannten Cardenoliden in ERYSIMUM-Arten deutlich unterscheiden.

Ziel und Aufgabe der vorliegenden Dissertation ist es, die drei chromatographisch nachgewiesenen Cardenolide in ERYSIMUM DECUMBENS Dennst. zu isolieren, ihre Struktur zu ermitteln und sie chemotaxonomisch einzuordnen.

II. BOTANISCHE MERKMALE VON ERYSIMUM DECUMBENS (SCHLEICHER ex WILLD.) DENNST., Hort. Belved. 1:38 (1820), (ERYSIMUM OCHROLEUCUM DC. nom. illegit., E. DUBIUM (SUTER) THELL., non DC.)

1. Systematische Stellung der Brassicaceae und besondere Familienmerkmale

Zum Verständnis der botanischen Merkmale der Gattung ERYSIMUM und der Einordnung der zu untersuchenden Art ERYSIMUM DECUMBENS Dennst. seien hier einleitend zunächst die heute geltenden Vorstellungen zur Systematik der Brassicaceae aufgeführt.

Die Brassicaceae stehen nach CHRONQUIST (14) und TAKHTAJAN (104) in der Ordnung der Capparales und in der Unterklasse Dilleniidae.

Nach CHRONQIUST wird die Ordnung Capparales in fünf Familien unterteilt:

a) Brassicaceae, b) Capparaceae, c) Resedaceae, d) Moringaceae, e) Tovariaceae

und nach TAKHTAJAN in acht Familien:

a) Capparaceae, b) Koeberliniaceae, c) Pentadiplandraceae, d) Tovariaceae, e) Moringaceae, f) Brassicaceae, g) Resedaceae, h) Emblingiaceae.

Früher wurden die Capparales vielfach mit den Papaverales zu einer Ordnung, den Rhoeadales, zusammengefaßt (17). Die völlig verschiedenen Inhaltsstoffe sowie die unterschiedlichen serologischen, embryologischen und palynogischen Befunde ließen eine Abtrennung der Capparales und Papaverales sinnvoll erscheinen (14,31,40,104).

Die vielgestaltige Familie der Brassicaceae umfaßt ungefähr 350 Gattungen mit insgesamt etwa 3000 Arten (40); davon kommen über 100 Arten allein in Mitteleuropa wild wachsend vor. Wegen des erstaunlich einheitlichen Baues von Blüten und Früchten ist die Abgrenzung der intrafamiliären Einheiten oft schwierig.

Familienmerkmale nach Hegnauer:

" Einjährige, zweijährige oder ausdauernde krautige Pflanzen mit recht verschieden gestalteten, nebenblattlosen Blättern. Blüten zwittrig und aktinomorph mit 4 Kelchblättern, 4 Kronblättern, 6 (2+4) Staubblättern und oberständigem, zweifächerigem Fruchtknoten. Frucht meist eine hülsenartige Kapsel mit falscher Scheidewand (= Schote oder Schötchen). Samen mit großem Embryo. Blütendiagramm: $K_4C_4A_{2:0+4}G_{(\underline{4})}$. Allgemein verbreitet ist das Vorkommen von Myrosinzellen ... "

2. Botanische Beschreibung der Art ERYSIMUM DECUMBENS (Schleicher ex Willd.) Dennst. und geographische Verbreitung dieser Art

Die sehr schwierige und komplexe Gattung ERYSIMUM mit etwa 80 Arten wird ausführlich von HEGI (39) im vierten Band der " Illustrierten Flora von Mittel-Europa " und von BALL (2) im ersten Band der " Flora Europaea " beschrieben. Umfangreiche cytotaxonomische Arbeiten von FAVARGER (22) und POLATSCHEK (84) bringen durch die Bestimmung der Chromosomenzahlen weitere Klarheit in die Systematik der Gattung ERYSIMUM.

ERYSIMUM DECUMBENS Dennst. wird von HEGI (39) unter dem Synonym ERYSIMUM OCHROLEUCUM DC., blaßgelber Schöterich, beschrieben:

" Ausdauernd, 10-40 cm hoch, grauhaarig. Wurzel spindelförmig. Sprosse einzeln bis zahlreich, verzweigt, locker mit den Resten der abgestorbenen Laubblätter bedeckt, in sterile Blattrosetten oder in Blütentrauben auslaufend. Zweige niederliegend, am Ende bogigaufsteigend, Pflanze dadurch lockerrasig. Stengel bogigaufsteigend, oder aufrecht, einfach, mit 2-schenkeligen, parallelen, angedrückten Haaren besetzt. Rosettenblätter lineal-lanzettlich bis schmal- verkehrteilänglich, in den langen Stiel verschmälert, entfernt gezähnt oder fast ganzrandig, von 2-schenkeligen, parallelen angedrückten Haaren grau. Stengelblätter lineal-lanzettlich, in den stielartigen Blattgrund verschmälert, ganzrandig oder spärlich gezähnt.

Blüten in ziemlich armblütiger, dichter Traube auf 2-3 mm langen, aufrecht-abstehenden, dicht behaarten Stielen.

Kelchblätter (4) 10-15 mm lang, lineal-länglich, im vorderen Teil weißhautrandig, grauhaarig, gelblichgrün, unter der Spitze kurz gehörnelt. Die äußeren Kelchblätter sind am Grunde kurz gesackt.

Kronblätter 1.5-2 cm lang, mit schmalen, 2/3 der Länge einnehmendem Nagel und mit rundlich-verkehrteiförmiger, plötzlich in den Nagel verschmälerter Platte, kahl, anfangs zitronen- später strohgelb. Längere Staubblätter 1.5 cm lang.

Früchte in lockerer Traube auf 3-5 mm langen, aufrecht-abstehenden Stielen, lineal, zusammengedrückt-vierkantig, grauhaarig. Griffel 3 mm lang, spärlich behaart.

Narbe 1 mm breit, viel breiter als der Griffel, 2-lappig.

Vorkommen: Im Westjura und in den Westalpen vor allem auf offenen warm-trockenen Kalkgeröllhalden von 350 m bis über 1500 m Höhe.

Allgemeine Verbreitung: Pyrenäen, Corbières, französische West-

alpen, Französischer Jura (Colombien de Gex, Reculet), Schweizer Jura. Verbreitung im Gebiet westl. Schweizer Jura: Dôle, Roche Bresanche, Vallée de Joux, von Le Pout bis Vallorbe, Creux du Van, Chasseral ..."

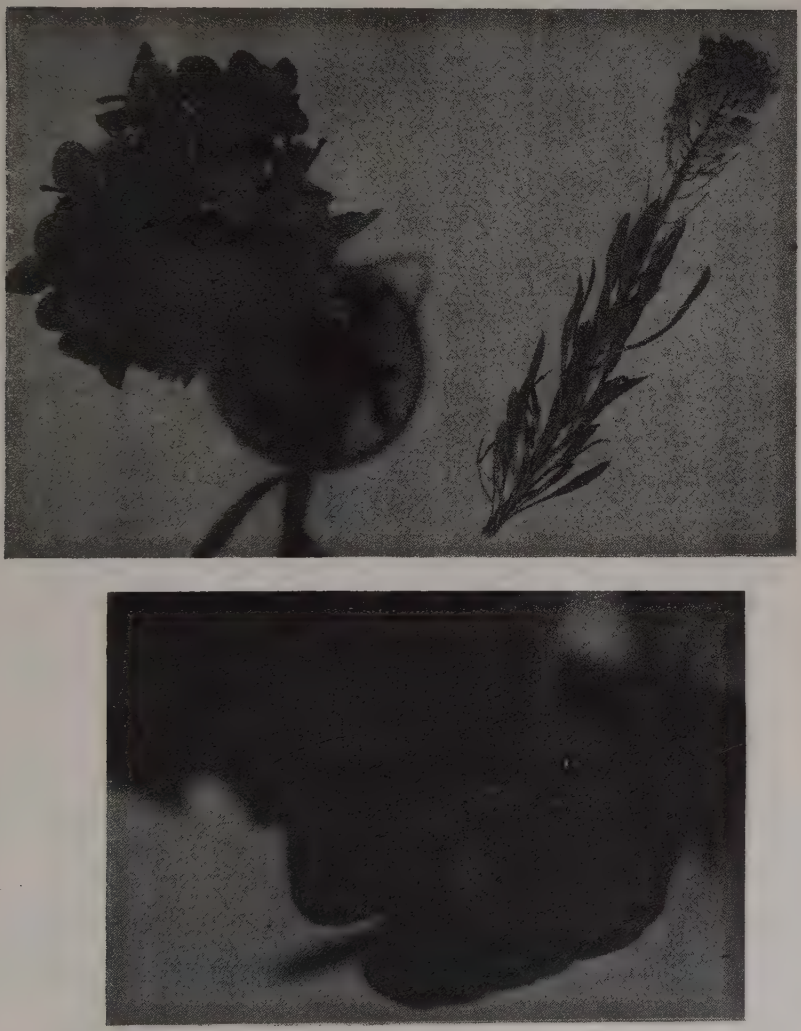


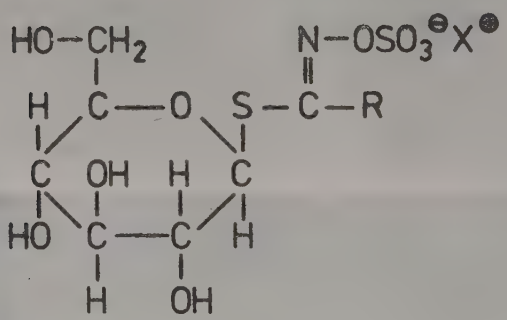
Abb. 1 ERYSIMUM DECUMBENS Dennst.

III. CHARAKTERISTISCHE INHALTSSTOFFE DER GATTUNG ERYSIMUM

1. Glucosinolate

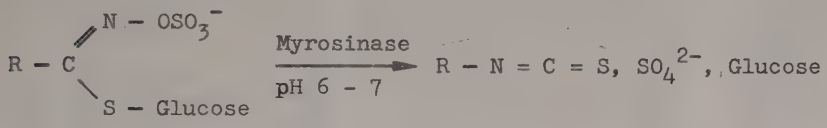
1.1. Chemie der Glucosinolate

Die Glucosinolate sind eine charakteristische Stoffklasse der Brassicaceae und somit auch ein durchgängiges Merkmal in der Gattung ERYSIMUM. Nach ETTLINGER und LUNDEEN (20) handelt es sich bei den Glucosinolaten um S-(ß-D-1-Glucopyranosyl)-alkylthiohydroximsäure-O-sulfate, also um einheitlich gebaute Verbindungen der Formel:



Gleichzeitig mit dem Glucosinolat-Vorkommen ist auch das Auftreten von spezifischen ß-Thioglucosidasen charakteristisch, die früher unter die Sammelbezeichnung " Myrosinase " fielen. Heute teilt man die " Myrosinase " in Isoenzyme (ß-Thioglucosidasen) auf, die entweder durch l-Ascorbinsäure aktiviert werden können oder deren Aktivität durch l-Ascorbinsäure nicht beeinflußt wird.

Nach Zerstörung oder Verletzung von Zellen (19) kommt es zu einer Einwirkung des Enzyms auf das Substrat, wobei in einem ersten Schritt die Thioglucosid-Bindung gespalten wird. In einem zweiten Schritt tritt eine Art Lossen-Umlagerung ein unter Bildung eines Isothiocyanats, wobei gleichzeitig (nicht enzymatisch) der Sulfat-Rest abgestoßen wird (20).



Die gebildeten Isothiocyanate können flüssig oder kristallin sein. Je nach Flüchtigkeit oder Lipophilität riechen bzw. schmecken sie mehr oder weniger stechend oder scharf. Oft treten die Isothiocyanate nur als Zwischenprodukte auf, die spontan cyclisieren oder unter Freisetzung von Rhodanid zerfallen. Bei den Glucosinolaten der Gattung ERYSIMUM handelt es sich bevorzugt um biogenetisch von Methionin abgeleitete Thioglucoside - z.B. Sinigrin, Glucocheirolin, Glucoiberin etc. - also um ω-Methylthioalkyl-, ω-Methylsulfinyl-, ω-Methylsulfonylglucosinolate und ihre in 3-Stellung hydroxylierten Derivate sowie um das 3-Methoxycarbonylpropylglucosinolat, das bisher nur in einigen wenigen Arten von ERYSIMUM gefunden wurde.

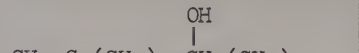
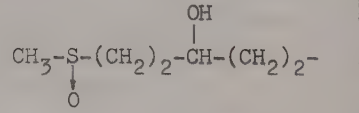
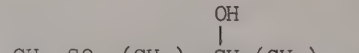
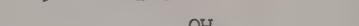
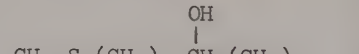
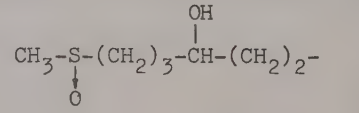
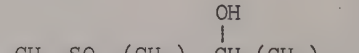
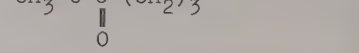
1.2. Spezifische Glucosinolate der Gattung ERYSIMUM

Tabelle I bringt eine Zusammenfassung der spezifischen Glucosinolate der Gattung ERYSIMUM:

Tabelle I: Spezifische Glucosinolate* der Gattung ERYSIMUM (19)

..	R	Name des Glucosinolats	Trivialname
I.	CH_2=CH-CH_2-	Allylglucosinolat	Sinigrin
II.	CH_3-S-$(CH_2)_3$-	3-Methylthiopropyl-	Glucoibervirin
III.	CH_3-S(=O)-$(CH_2)_3$-	3-Methylsulfinylpropyl-	Glucoiberin
IV.	CH_3-SO_2-$(CH_2)_3$-	3-Methylsulfonylpropyl-	Glucocheirolin
V.	CH_3-S-$(CH_2)_4$-	4-Methylthiobutyl-	Glucoerucin
VI.	CH_3-S(=O)-$(CH_2)_4$-	4-Methylsulfinylbutyl-	Glucoraphanin
VII.	CH_3-SO_2-$(CH_2)_4$-	4-Methylsulfonylbutyl-	Glucoerysolin
VIII.	CH_3-S-$(CH_2)_5$-	5-Methylthiopentyl-	
IX.	CH_3-S(=O)-$(CH_2)_5$-	5-Methylsulfinylpentyl-	
X.	CH_3-SO_2-$(CH_2)_5$-	5-Methylsulfonylpentyl-	

* Nach der von ETTLINGER und DATEO 1961 (18) eingeführten Nomenklatur erhalten die Glucosinolate die chemische Bezeichnung der Seitenkette als Präfix.

XI.		3-Hydroxy-5-methylthiopentyl-	
XII.		3-Hydroxy-5-Methylsulfinylpentyl-	
XIII.		3-Hydroxy-5-methylsulfonylpentyl-	
XIV.		6-Methylthiohexyl-	
XV.		3-Hydroxy-6-methylthiohexyl-	
XVI.		3-Hydroxy-6-methylsulfinylhexyl-	
XVII.		3-Hydroxy-6-methylsulfonylhexyl-	
XVIII.		3-Carbomethoxypropyl-	" Glucoerypestrin "*

* Der Trivialname Glucoerypestrin ist irrtümlich gegeben und beruht auf einer Verwechslung des Saatguts. Nachträgliche Bestimmung der als " ERYSIMUM RUPESTRE " deklarierten Samen durch FAVARGER ergab, daß es sich dabei um ERYSIMUM ODORATUM Ehrh. handelte (35).

1.3. Glucosinolat-Vorkommen in den ERYSIMUM-Arten

Tabelle II bringt eine Aufstellung der bis heute bekannten Glucosinolate in den ERYSIMUM-Arten:

Anmerkung: In vielen Fällen wurden die Glucosinolate lediglich durch PC charakterisiert. Sie sind deshalb mit einem $^{+}$ gekennzeichnet.

Eine umfassende Bearbeitung aller ERYSIMUM-Glucosinolate durch chemische Charakterisierung wäre sehr wünschenswert und in chemotaxonomischer Hinsicht aufschlußreich.

Tabelle II: Glucosinolat-Vorkommen in den ERYSIMUM-Arten

ERYSIMUM-Arten	Inhaltsstoffe	Lit.
E. alpinum +	I. Sinigrin	32,95
E. arcansanum Nutt.	IV. Glucocheirolin	92,94
E. cheiranthoides L.	IV. Glucocheirolin III. Glucoiberin	34,48 96,116
E. crepidifolium Rchb.	V. Glucoerucin VI. Glucoraphanin VII. Glucoerysolin	34
E. helveticum (Jaquin) A.P.DC. +	I. Sinigrin	32,95
E. x. Marshalli (Stark ex Moore) Bois. (syn. Cheiranthus x allioni hort., E. allioni hort.)	V. Glucoerucin VI. Glucoraphanin VII. Glucoerysolin	
E. nanum Boiss et Hohen +	IV. Glucocheirolin	94
E. decumbens (Schleicher ex Willd.) Dennst.	II. Glucoibervirin III. Glucoiberin	35
E. odoratum Ehrh. (= E. pannonicum Crantz)	XVIII. Glucoerypestrin	35
E. pachycarpum hort. fil. et Thoms.+	IV. Glucocheirolin	32,95,96,116

ERYSIMUM-Arten	Inhaltsstoffe		Lit.
E. perofskianum Fisch. et Mey.	V.	Glucoerucin	8, 34, 36
	VI.	Glucoraphanin	48, 93
	VII.	Glucoerysolin	96, 116
E. pumilum DC.	IV.	Glucocheirolin	32, 95
	XVIII.	Glucoerypestrin	96, 116
E. rhaeticum Schleich. ex DC.	VIII.	5-Methylthiopentylglucosinolat	51
	XI.	3-Hydroxy-5-methylthiopentylglucosinolat	
	XII.	3-Hydroxy-5-methylsulfinylpentylglucosinolat	
	XIII.	3-Hydroxy-5-methylsulfonylpentylglucosinolat	
	XIV.	6-Methylthiohexylglucosinolat	
	XV.	3-Hydroxy-6-methylthiohexylglucosinolat	
	XVI.	3-Hydroxy-6-methylsulfinylhexylglucosinolat	
	XVII.	3-Hydroxy-6-methylsulfonylhexylglucosinolat	
E. rupestre DC.	XVIII.	Glucoerypestrin	49, 96
		(Diese Art erwies sich als Verwechslung mit	116
		ERYSIMUM odoratum Ehrh.)	
E. strictissimum L. +		Bei diesen Arten wurden die Glucosinolate	32, 95
E. vincoleucum +		nur im PC nachgewiesen.	96, 116

ERYSIMUM-Arten	Inhaltsstoffe	Lit.
E. virgatum Roth	VIII. 5-Methylthiopentylglucosinolat	50
	IX. 5-Methylsulfinylpentylglucosinolat	
	XI. 3-Hydroxy-5-methylthiopentylglucosinolat	
	XII. 3-Hydroxy-5-methylsulfinylpentylglucosinolat	
	XIII. 3-Hydroxy-5-methylsulfonylpentylglucosinolat	

2. Cardenolide

JARETZKY und WILKE (44) haben die Familie der Brassicaceae systematisch auf das Vorkommen herzwirksamer Glykoside untersucht. Alle CHEIRANTHUS- und alle 35 untersuchten ERYSIMUM-Arten erwiesen sich als herzwirksam.
Durch Arbeiten von REICHSTEIN und Mitarbeitern wie auch von verschiedenen russischen Autoren, die sich mit der chemischen Erforschung der Cardenolide beschäftigten, konnten diese Angaben bestätigt werden (5,79,91,97,98,100 und Lit. bei den einzelnen ERYSIMUM-Arten). Später fand man Cardenolide auch in Arten der Gattung Syrenia, Achachmena und Conringia, die alle der Gattung ERYSIMUM nahestehen (40).
Nach bisherigen Untersuchungen sind Cardenolide auf diese wenigen Arten und Genera beschränkt. Sie sind ein durchgehendes Merkmal der Gattung ERYSIMUM und CHEIRANTHUS, nicht aber der übrigen Familie der Brassicaceae.
Cardenolide kommen in allen Teilen der Pflanzen vor, werden aber in den Samen in größter Konzentration angetroffen. Meist liegen komplizierte Glykosidgemische vor, von denen einige wenige mengenmäßig überwiegen.

2.1. Chemie der Cardenolide

Ihre Aglyka sind C_{23}-Steroide mit einem α,ß-ungesättigten γ-Lactonring (Butenolidring) an C-17, einer 14ß-ständigen und einer 3ß-ständigen OH-Gruppe. Als Prototyp kann das Digitoxigenin (Abb. 2) bzw. auch das an C-5 isomere Uzarigenin, dessen Derivate in ERYSIMUM und CHEIRANTHUS relativ

häufig anzutreffen sind, angesehen werden(90).

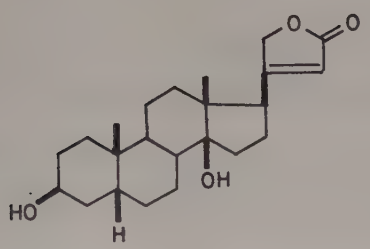


Abb. 2 Digitoxigenin

Alle bisher bekannten Cardenolide unterscheiden sich:

a) durch Isomerie an C-3, C-5 oder C-17

b) durch weitere OH-Gruppen in 1ß-, 2α-, 5ß-, 11α-, 12ß-, 15ß-, 16ß- und in 19-Stellung, die teilweise noch verestert sein können,oder Oxo-Gruppen an C-11, C-12 und C-19

c) durch zusätzliche Doppelbindungen an C-4, C-5 oder C-16

d) selten durch Epoxygruppen.

Von den Zuckern kommen D-Glucose und L-Rhamnose häufig vor, daneben aber auch zahlreiche seltene Zucker (z.B. Digitoxose, Boivinose etc.), die nur in dieser Naturstoffklasse angetroffen werden. Die Zucker bei den Cardenoliden sind C-3-glykosidisch mit dem Aglykon verknüpft.

Liegt ein Oligosaccharid-Anteil vor, ist dieser linear gebunden und am Ende der Kette befindet sich in der Regel eine Hexose (meist D-Glucose). In jüngster Zeit sind auch Trigly-

koside isoliert worden, die endständig mit Sinapinsäure verestert sind (74).

2.2. Biosynthese der Cardenolide

Für zahlreiche tierische und pflanzliche Steroide ist ein Biosyntheseweg, ausgehend von Acetat über Mevalonsäure, Squalen und Lanosterol zu Cholesterol und einem sich anschließenden Abbau zu einem Pregnanderivat vorgeschlagen und teilweise bewiesen worden (21,90).
Die Vermutung lag daher nahe, daß auch die Biosynthese der Cardenolide auf dem gleichen Weg erfolgt.
RAMSTAD und BEAL (87) sowie auch GREGORY und LEETE (37) zeigten in analogen Versuchen mit markierter DL-Mevalonsäure-$[2\text{-}^{14}C]$ an Digitalis lanata und Digitalis purpurea, daß das Digitoxigenin keine Radioaktivität im Butenolidring enthielt. Dies sprach dafür, daß zumindest die 19C-Atome des Steringerüstes aus Mevalonsäure über Squalen gebildet wurden.
GREGORY und LEETE (37) äußerten nach weiteren Versuchen mit markierter Essigsäure-$[1\text{-}^{14}C]$, daß auch die C-Atome 20 und 21 aus Mevalonsäure stammen könnten, und daß ein 20-Oxopregnanderivat die unmittelbare Vorstufe bei der Biosynthese des Digitoxigenin sein könnte.
Die Resultate von EUW und REICHSTEIN (21) sowie von TSCHESCHE und LILIENWEISS (109) bestätigten diese Vermutung, indem sie zeigten, daß Digitalis-Pflanzen einmal $[3\text{-}^{14}C]$-Mevalonsäure und zum anderen $[21\text{-}^{14}C]$-5-Pregnen-3ß-ol-20-on-glucosid zur Synthese der Cardenolide Digitoxigenin, Gitoxigenin u.a. verwerteten.

Den endgültigen Beweis für die Bildung eines aus 21C-Atomen bestehenden Zwischenproduktes bei der Biosynthese der Cardenolide erbrachten CASPI und Mitarbeiter (12); sie konnten zeigen, daß Digitalis purpurea in der Lage ist, Cholesterol in 5-Pregnen-3ß-ol-20-on umzuwandeln, und TSCHESCHE und Mitarbeiter (108), daß auch Digitalis lanata aus Cholesterol Digitoxigenin bildet.

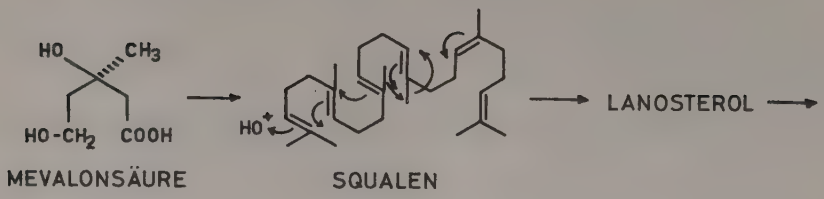
Unbeantwortet war die Frage, zu welchem Zeitpunkt die Hydroxylierung am C-Atom 14 erfolgt, die als 14ß-OH bei fast allen natürlich vorkommenden Aglyka der Cardenolid-Reihe zu finden ist.

TSCHESCHE und Mitarbeiter(106,108) bewiesen, daß auf der Stufe des 5ß-Pregnan-3ß-ol-20-on die Hydroxylierung an C-14 zu einer 14ß-OH-Verbindung erfolgt. Dann schließt sich eine Hydroxylierung am C-Atom 21 zu 5ß-Pregnan-3ß,14ß,21-triol-20-on an und mit zwei weiteren C-Atomen (Essigsäure) wird vollends der Butenolidring aufgebaut.

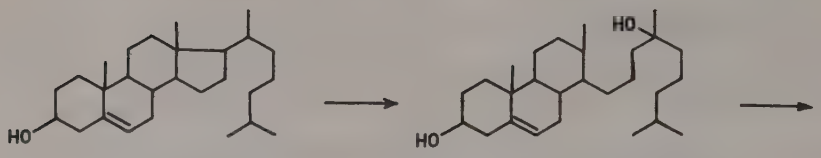
Zur gleichen Zeit fanden BENNETT und Mitarbeiter (4), daß Digitalis lanata aus Progesteron nicht nur Cardenolide (Digitoxigenin, Digoxigenin, Gitoxigenin) bildet, sondern auch 21C-Steroid-Derivate (5α-Pregnan-3,20-dion, 5ß-Pregnan-3,20-dion, 5α-Pregnan-3ß-ol-20-on, 5-Pregnen-3ß-ol-20-on).

Mit allen Verbindungen, die als Precursoren nachgewiesen wurden, läßt sich die Biosynthese folgendermaßen darstellen (107):

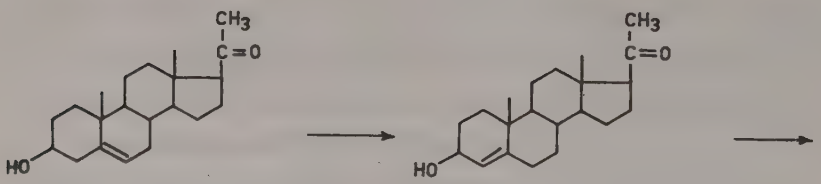
BIOSYNTHESEWEG DER CARDENOLIDE



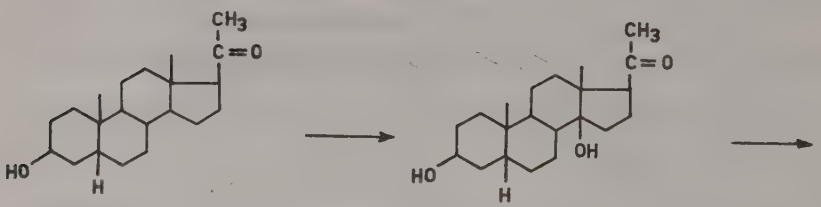
MEVALONSÄURE SQUALEN



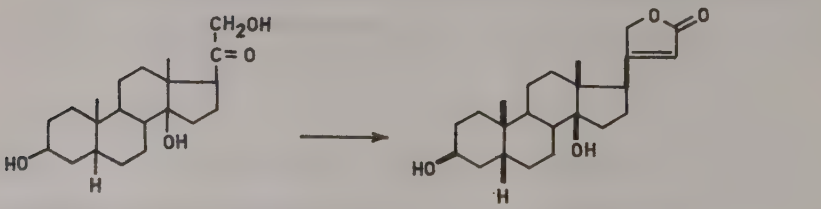
CHOLESTEROL 20α-HYDROXYCHOLESTEROL



5-PREGNEN-3β-OL-20-ON PROGESTERON



5β-PREGNAN-3β-OL-20-ON 5β-PREGNAN-3β,14β-DIOL-20-ON

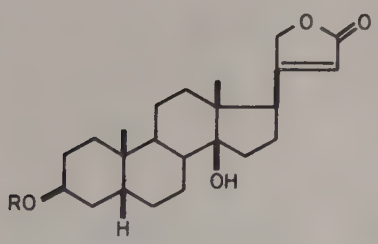


5β-PREGNAN-3β,14β,21-TRIOL-20-ON DIGITOXIGENIN

Mevalonsäure → Cholesterol (12) → 20-Hydroxycholesterol (13) → 5-Pregnen-3ß-ol-20-on (109) → Progesteron (11) → 5ß-Pregnan-3ß-ol-20-on (106-108) → 5ß-Pregnan-3ß, 14ß-diol-20-on (106-108) → 5ß-Pregnan-3ß,14ß,21-triol-20-on (106-108) → Digitoxigenin (Abb.2).

Die Einführung weiterer Hydroxylgruppen kann als 12ß-OH sowohl auf der Pregnanstufe vor Einführung der 14ß-OH-Gruppe, als auch auf der Cardenolidstufe stattfinden, die der 16ß-OH wahrscheinlich nur auf der Pregnanstufe (106,107).

2.3. Cardenolide der Gattung ERYSIMUM

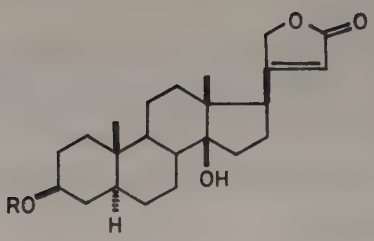


I. Digitoxigenin, $C_{23}H_{34}O_4$, R=H

II. Evomonosid, $C_{29}H_{44}O_8$, R= α-L-rhamnosyl →

III. Glucoevomonosid (Evobiosid), $C_{35}H_{54}O_{13}$, R=ß-D-glucosyl-(1→4)-α-L-rhamnosyl →

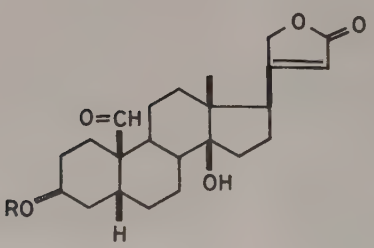
IV. Glucodigifucosid, $C_{35}H_{54}O_{13}$, R=ß-D-glucosyl-(1→4)-ß-D-fucosyl →



V. Uzarigenin, $C_{23}H_{34}O_4$, R=H

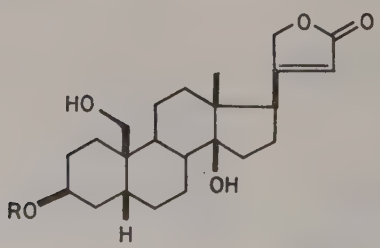
VI. Desglucocheirosid A, $C_{29}H_{44}O_8$, R=ß-D-fucosyl →

VII. Cheirosid A, $C_{35}H_{54}O_8$, R=ß-D-glucosyl-(1→ 4)-ß-D-fucosyl →



VIII. Cannogenin, $C_{23}H_{32}O_9$, R=H

IX. Cheiranthosid, $C_{29}H_{42}O_9$, R=ß-D-gulomethylosyl →

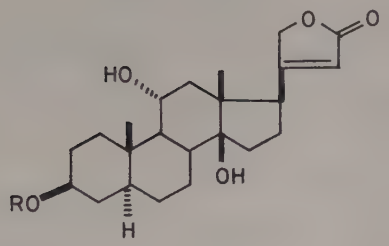


X. Cannogenol, $C_{23}H_{34}O_5$, R=H

XI. Glucocannogenol, $C_{29}H_{44}O_{10}$, R=ß-D-glucosyl →

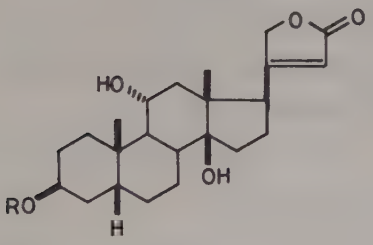
XII. Desglucoerycordin, $C_{29}H_{44}O_9$, R=ß-D-gulomethylosyl →

XIII. Erycordin, $C_{35}H_{54}O_{14}$, R=ß-D-glucosyl-(1→4)-ß-D-gulomethylosyl →



XIV. Alliotoxigenin (11α-hydroxyuzarigenin), $C_{23}H_{34}O_5$, R=H

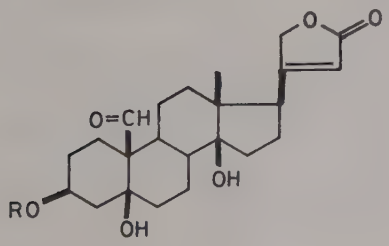
XV. Alliotoxin, $C_{29}H_{44}O_9$, R=α-L-rhamnosyl →



XVI. Sarmentogenin, $C_{23}H_{34}O_5$, R=H

XVII. Sarmentogulomethylosid, $C_{29}H_{44}O_9$, R=ß-D-gulomethylosyl →

XVIII. Gulosarmentoglucosid, $C_{35}H_{54}O_{14}$, R=ß-D-glucosyl-(1→4)-ß-D-gulomethylosyl →



IXX. Strophanthidin, $C_{23}H_{32}O_6$, R=H

XX. Glucostrophanthidin, $C_{29}H_{42}O_{11}$, R=ß-D-glucosyl ⟶

XXI. Erysimin, $C_{29}H_{42}O_9$, R=ß-D-digitoxosyl ⟶

XXII. Chorchorosid A, $C_{29}H_{42}O_9$, R=ß-D-boivinosyl ⟶

XXIII. Cabulosid, $C_{29}H_{42}O_{10}$, R=ß-2-deoxy-D-gulosyl ⟶

XXIV. Desglucocheirotoxin, $C_{29}H_{42}O_{10}$, R=ß-D-gulomethylosyl ⟶

XXV. Perofskosid, $C_{29}H_{42}O_{10}$, R=ß-2-deoxy-D-glucosyl ⟶

XXVI. Erychrosid, $C_{34}H_{50}O_{13}$, R=ß-D-xylosyl-(1 ⟶ 4)-ß-D-digitoxosyl ⟶

XXVII. Erysimosid, $C_{35}H_{52}O_{14}$, R=ß-D-glucosyl-(1 ⟶ 4)-ß-D-digitoxosyl ⟶

XXVIII. Eryperosid, $C_{35}H_{52}O_{14}$, R=α-D-glucosyl-(1 ⟶ 4)-ß-D-digitoxosyl ⟶

XXIX. Erycorchosid, $C_{35}H_{52}O_{14}$, R=α-D-glucosyl-(1 ⟶ 4)-ß-D-boivinosyl ⟶

XXX. Cheirotoxin, $C_{35}H_{52}O_{15}$, R=ß-D-glucosyl-(1 ⟶ 4)-ß-D-gulomethylosyl ⟶

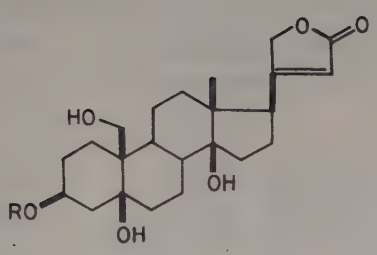
XXXI. Erycanosid, $C_{35}H_{52}O_{15}$, R=ß-D-glucosyl-(1 ⟶ 4)-ß-2-deoxy-D-glucosyl ⟶

XXXII. Eryscenosid, $C_{35}H_{52}O_{15}$, R=ß-D-glucosyl-(1 ⟶ 4)-ß-2-deoxy-D-galactosyl ⟶

XXXIII. Erythrisid, $C_{40}H_{60}O_{18}$, R=ß-D-glucosyl-(1 ⟶ 4)-ß-D-xylosyl-(1 ⟶ 4)-ß-D-digitoxosyl ⟶

XXXIV. Glucoerysimosid, $C_{41}H_{62}O_{19}$, R=ß-D-glucosyl-(1 ⟶ 4)-ß-D-glucosyl-(1 ⟶ 4)-ß-D-digitoxosyl ⟶

XXXV. Glucostrophallosid, $C_{35}H_{52}O_{15}$, R=ß-D-glucosyl-(1 ⟶ 4)-ß-D-allomethylosyl ⟶



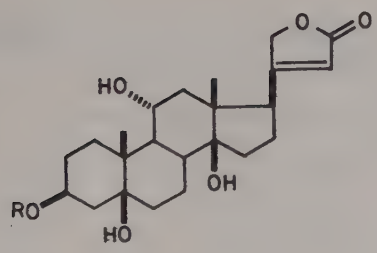
XXXVI. Strophanthidol, $C_{23}H_{34}O_6$, R=H

XXXVII. Helveticosol, $C_{29}H_{44}O_9$, R=ß-D-digitoxosyl ⟶

XXXVIII. Erychrosol, $C_{34}H_{52}O_{13}$, R=ß-D-xylosyl-(1 ⟶ 4)-ß-D-digitoxosyl ⟶

IXL. Erysimosol, $C_{35}H_{54}O_{14}$, R=ß-D-glucosyl-(1 ⟶ 4)-ß-D-digitoxosyl ⟶

XL. Glucoerysimosol, $C_{41}H_{64}O_{19}$, R=ß-D-glucosyl-(1 ⟶ 4)-ß-D-glucosyl-(1 ⟶ 4) -ß-D-digitoxosyl –



XLI. Bipindogenin, $C_{23}H_{34}O_6$, R=H

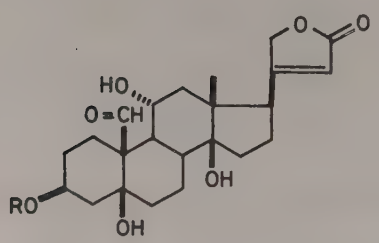
XLII. Allisid, $C_{29}H_{44}O_{10}$, R=α-L-glucomethylosyl ⟶

XLIII. Glucoallisid, $C_{35}H_{54}O_{15}$, R=ß-D-glucosyl-(1 ⟶ 4)-α-L-glucomethylosyl ⟶

XLIV. Lokundjosid, $C_{29}H_{44}O_{10}$, R=α-L-rhamnosyl ⟶

XLV. Bipindogulomethylosid, $C_{29}H_{44}O_5$, R=ß-D-gulomethylosyl ⟶

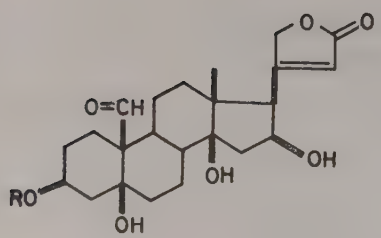
XLVI. Glucobipindogulomethylosid, $C_{35}H_{54}O_{10}$, R=ß-D-glucosyl-(1 ⟶ 4)-ß-D-gulomethylosyl ⟶



XLVII. Nigrescigenin, $C_{23}H_{32}O_7$, R=H

XLVIII. Canescein, $C_{29}H_{42}O_{11}$, R=ß-D-gulomethylosyl ⟶

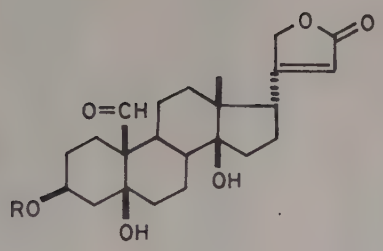
IL. Glucocanescein, $C_{35}H_{52}O_{16}$, R=ß-D-glucosyl-(1 ⟶ 4)-ß-D-gulomethylosyl ⟶



L. Strophadogenin, $C_{23}H_{32}O_7$, R=H

LI. Gypsobiosid, $C_{34}H_{50}O_{14}$, R=ß-D-xylosyl-(1 ⟶ 4)-ß-D-digitoxosyl ⟶

LII. Gypsotriosid, $C_{40}H_{60}O_{19}$, R=ß-D-glucosyl-(1 ⟶ 4)-ß-D-xylosyl-(1 ⟶ 4)-digitoxosyl ⟶



LIII. 17α-Strophadogenin, $C_{23}H_{32}O_7$, R=H

LIV. 17α-Gypsobiosid, $C_{34}H_{50}O_{14}$, R=ß-D-xylosyl-(1 ⟶ 4)-ß-D-digitoxosyl ⟶

2.4. Allgemeine Verbreitung von Cardenoliden in ERYSIMUM-Arten

In Tabelle III sind die Cardenolide, die bisher aus ERYSIMUM-Arten isoliert wurden, zusammengestellt:

Anmerkung: Für Helveticosid werden in der Literatur folgende Namen verwendet: Erysimin, Erysimotoxin, Alliosid A und Syreniotoxin

Tabelle III: Cardenolide aus ERYSIMUM-Arten

ERYSIMUM-Arten	Cardenolide	Lit.
E. altaicum C.A.M.	Helveticosid, Erysimosid, Desglucocheirotoxin, Glycosid C (3 Aglyka, Z = D-Gulomethylose), Erydiffusid (4 Aglyka, Z = D-Gulomethylose)	81,77
E. badghysi (Korsh) Lipsky	Helveticosid, Erysimosid	77
E. carniolicum Doll.	Strophanthidin, Helveticosid	53,101
E. cheiranthoides L.	Helveticosid, Erysimosid, Desglucoerycordin, Erycordin, Corchorosid A, Erychrosid, Erythrisid, Erychrosol, Erysimosol, Glucodigifucosid, Helveticosol	71, 60, 68, 1, 115
E. clausioides Botsch. et Vved.	Helveticosid, Erysimosid	77
E. crepidifolium Rchb.	Helveticosid, Erysimosid, Erycordin, Glucostrophallosid	77, 80, 33, 34, 67
E. croceum M. Pop.	Helveticosid, Erysimosid	77
E. cuspidatum DC (M.B.)	Helveticosid, Erysimosid, Desglucocheirotoxin, Lokundjosid	77, 114
E. diffusum Ehrh. (= E. canescens Roth)	Helveticosid, Erysimosid, Cheirotoxin, Desglucocheirotoxin, Erycanosid, Eryscenosid, Canescein, Glucocanescein, (Erydiffusid)	3, 29, 57, 58, 56, 65, 70, 76, 77, 82, 112

ERYSIMUM-Arten	Cardenolide	Lit.
E. gypsaceum Botsch. et Vved.	Helveticosid, Erysimosid, Gypsobiosid, 17α-Gypsobiosid, Gypsotriosid, Erychrosid	113
E. helveticum (Jaquin) A.P. DC	Helveticosid, Glucodigifucosid, Helveticosol (?)	80
E. hieracifolium L. (respond. Juslenius) (=E. strictum Gaertn.)	Erysimosid, Erycorchosid (PC)	54
E. humillimum (Ldb.) N. Busch.	Erysimosid	77
E. leptophyllum M.B.	Glucodigifucosid	60
E. linifolium (Pers.) J. Gay	Erysimosid, Corchorosid A	77,85,86
E. marschallianum Andrz.	Helveticosid, Erysimosid, Sinapoyl-glucoerysimosid, Corchorosid A, Glucodigifucosid	77,60, 73,74,59
E. x. Marshalli (Stark ex Moore) Bois. (= Cheiranthus x allioni = E. allioni hort.)	Helveticosid, Erysimosid, Glucoerysimosid, Helveticosol, Erysimosol, Desglucoerycordin, Erycordin, Glucodigifucosid (= Allionin), Alliotoxin, Alliotoxigenin Allisid, Glucoallisid, Cheirosid A, Glucostrophanthidin, Evomonosid, Evobiosid, Glucocannogenol (Violin), Cheirotoxin, Sarmentogulomethylosid, Gulosarmentoglucosid	73,66, 60,61, 62,72, 52,69, 64 ↓

ERYSIMUM-Arten	Cardenolide	Lit.
E. x Marshalli (Stark ex Moore) Bois. (= Cheiranthus x allioni) ff.	Bipindogulomethylosid, Glucobipindogulomethylosid	↓
E. nuratense M. Pop.	Helveticosid, Erysimosid	77
E. odoratum Ehrh. (= E. pannonicum Crantz.)	Erysimosid, Erycorchosid (PC)	77, 54
E. perofskianum Fisch. et Mey.	Helveticosid, Erysimosid, Erycorchosid, Eryperosid, Corchorosid A, Kabulosid, Perofskosid	7, 55
E. pinifolium	Corchorosid A, Glykosid D (Strophanthidin + nicht identifizierter Zucker)	85, 86
E. pulchellum (Willd.) J. Gay	Erysimosid, Erycorchosid (PC)	54
E. repandum L.	Helveticosid, Erysimosid, Cheirotoxin, Erycorchosid (PC), Chalkosid (?)	26, 27, 43, 15, 54
E. silvestre Scop.	Erysimosid	77
E. suffruticosum Spr.	Helveticosid, Erysimosid, Glucodigifucosid, Desglucocheirotoxin, Desglucoerycordin, Canescein, Bipindogulomethylosid	77, 60, 64, 70
E. sylvaticum M.B.	Erysimosid	77

ERYSIMUM-Arten	Cardenolide	Lit.
E. transsilvanicum Schur.	Strophanthidin	30
E. violascens M. Pop.	Helveticosid, Erysimosid, Gypsobiosid	77
E. Witmannii Zaw.	Erysimosid, Erycorchosid (PC)	54

IV. BISHERIGE UNTERSUCHUNGEN VON ERYSIMUM DECUMBENS (SCHLEICHER EX WILLD.) DENNST.

" ERYSIMUM OCHROLEUCUM DC. " wurde 1957 erstmals untersucht. GMELIN und KJAER (49) berichten über das Vorkommen von 3-Carbomethoxypropylglucosinolat in den Samen von ERYSIMUM OCHROLEUCUM DC.. Spätere Nachprüfungen ergaben jedoch, daß eine Verwechslung unterlaufen war und es sich in Wirklichkeit um Samen von ERYSIMUM ODORATUM EHRH. (= E. pannonicum Crantz.) gehandelt hatte.

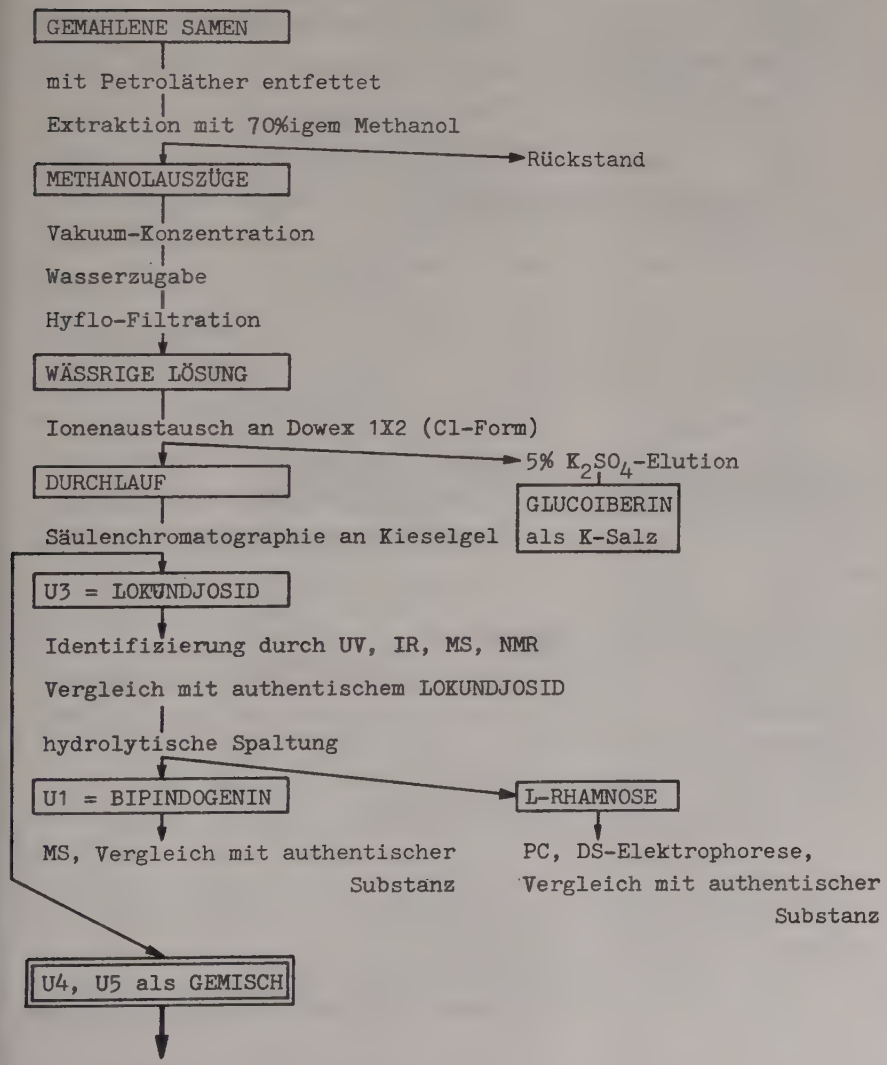
1969 untersuchten GMELIN und KJAER (35) dann authentisches Material von ERYSIMUM DECUMBENS Dennst., das FAVARGER 1961, 1962 im Schweizer Jura gesammelt hatte (Chromosomenzahl 2n=30).

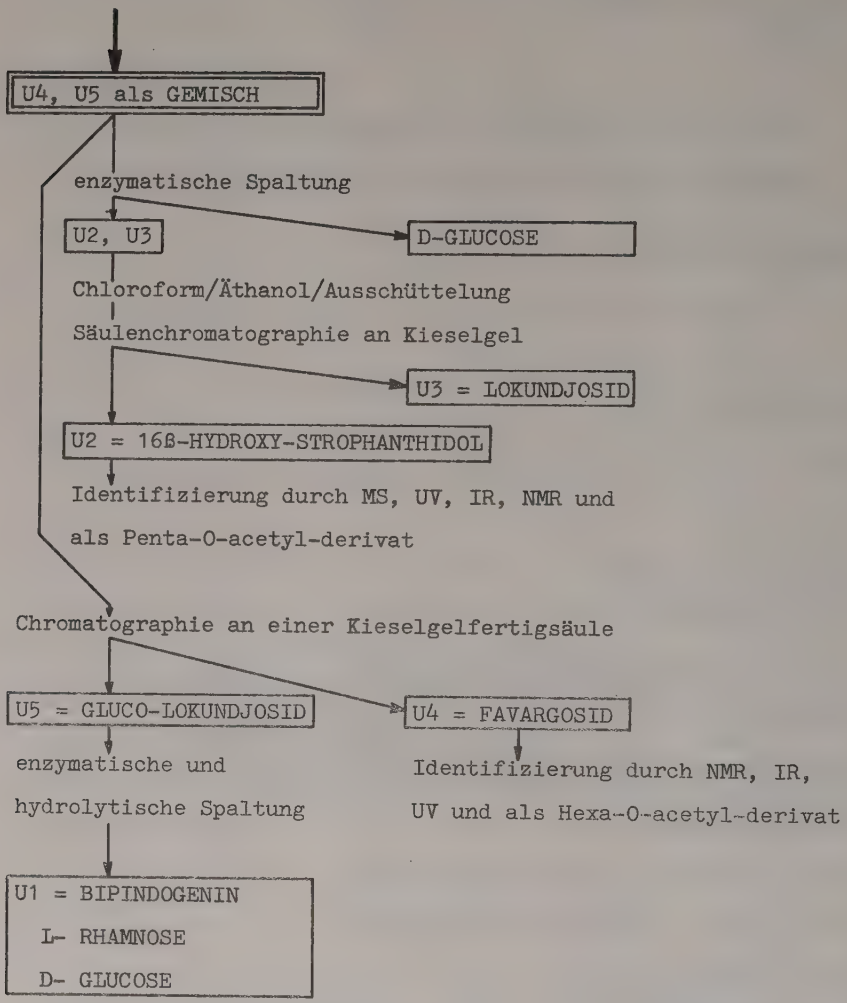
Sie charakterisierten zwei schon zuvor aus IBERIS-Arten bekannte Glucosinolate, das GLUCOIBERIN (=3-Methylsulfinylpropyl-) und das GLUCOIBERVIRIN (=3-Methylthiopropylglucosinolat), die zum ersten Mal in dieser Gattung gefunden worden waren, und zeigten, daß ERYSIMUM DECUMBENS Dennst. kein Sinapin enthält und sich dadurch von vielen anderen ERYSIMUM-Arten unterscheidet.

V. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

HAUPTTEIL

1. Schematische Darstellung des Trennungsganges bei der Isolierung der Substanzen U1, U2, U3, U4, U5




U4, U5 als GEMISCH
enzymatische Spaltung
U2, U3
D-GLUCOSE
Chloroform/Äthanol/Ausschüttelung
Säulenchromatographie an Kieselgel
U3 = LOKUNDJOSID
U2 = 16ß-HYDROXY-STROPHANTHIDOL
Identifizierung durch MS, UV, IR, NMR und
als Penta-O-acetyl-derivat
Chromatographie an einer Kieselgelfertigsäule
U5 = GLUCO-LOKUNDJOSID
U4 = FAVARGOSID
enzymatische und
hydrolytische Spaltung
Identifizierung durch NMR, IR,
UV und als Hexa-O-acetyl-derivat
U1 = BIPINDOGENIN
L- RHAMNOSE
D- GLUCOSE

2. Analytische und präparative Chromatographie der Herzglykoside aus ERYSIMUM DECUMBENS Dennst.

In ERYSIMUM DECUMBENS Dennst. waren bisher zwei Glucosinolate nachgewiesen und identifiziert worden. Zur Prüfung der Anzahl und Konzentration der Herzglykoside wurde 1 g gemahlener Samen mit Petroläther entfettet, anschließend mit 30 ml 70%igem Methanol extrahiert und die eingeengten und filtrierten Methanolauszüge dünnschichtchromatographisch analysiert.
Folgende Laufmittel erwiesen sich dabei als geeignet:
A:Methyläthylketon/Toluol/Wasser/Methanol/Eisessig 40:5:3:2,5:1,
B:Chloroform/Methanol 7:3 und
C:Butanol/Toluol/Wasser 4:1:1.
Durch Ansprühen mit Kedde-Reagenz (RI), Raymond-Reagenz (RII), Vanillin/Phosphorsäure (RIII), Vanillin/Schwefelsäure (RIV) ließen sich drei Hauptflecke sichtbar machen, die sich sowohl in ihrer Farbe als auch in der Fluoreszenz im UV-Licht deutlich voneinander unterschieden. Sie erhielten die Bezeichnungen U3, U4, U5; ihre Anfärbungen sind in Tab. IV beschrieben:

Bezeichnung	Rf x 100 Laufmittel			Farbreaktionen			
	A	B	C	R I	R II	R III	R IV
U3	33	41	30	rot-violett	blau	blaugrün UV: grün	blau-violett
U4	11	21	12,5	rot-violett	blau	gelbgrün UV: blau	rot-violett
U5	7	16	12	rot-violett	blau	blaugrün UV: grün	blau-violett

Tabelle IV: Rf-Werte und Farbreaktionen

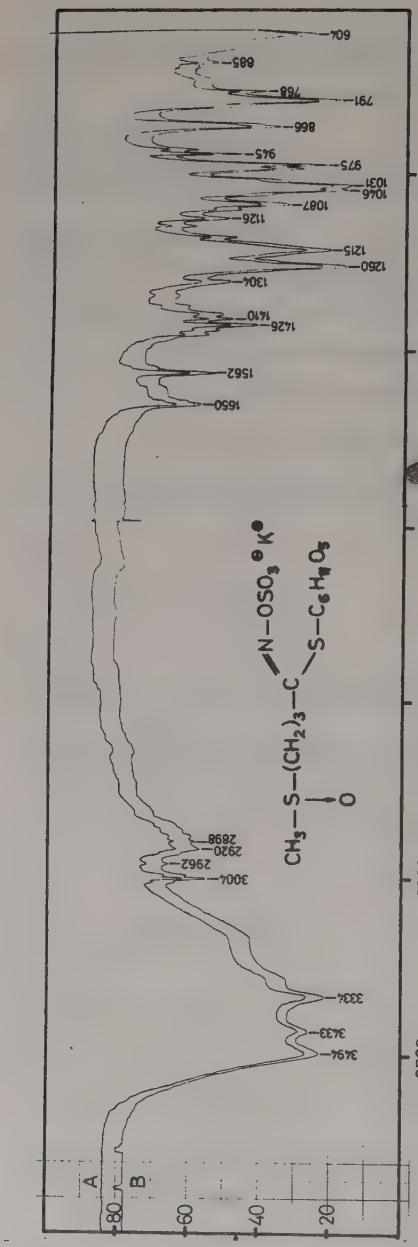


Abb.3 : IR-Absorptionsspektren von isoliertem (A) und authentischem GLUCOIBERIN (B)

Zur Isolierung der drei Substanzen wurden die Arbeitsmethoden der analytischen Dünnschichtchromatographie auf die präparative Säulenchromatographie übertragen. Da der Methanolextrakt auch die beiden Glucosinolate enthielt, trennte man diese - wie im Versuchsteil näher beschrieben - zunächst an einer Säule mit Dowex 1X2 (in Chloridform) von den Herzglykosiden ab. Während der Trennung oxidierte das 3-Methylthiopropylglucosinolat zu 3-Methylsulfinylpropylglucosinolat, so daß nur das 3-Methylsulfinylpropylglucosinolat (GLUCOIBERIN) als Kalium-Salz gewonnen werden konnte (Abb.3).

Der Herzglykosidextrakt wurde mit Kieselgel " Woelm " als stationärer Phase und Butanol/Toluol/Wasser 4:1:5 (Oberphase) als mobiler Phase säulenchromatographisch aufgetrennt. Mit dieser Chromatographie gelang es, die Substanz U3 kristallin und U4 und U5 als amorphes Gemisch zu erhalten.

Das Gemisch aus U4 und U5 wurde zunächst einer enzymatischen Spaltung mit Cellulase, einer ß-Glucosidase, unterworfen, wobei sich nach acht Tagen aus der Substanz U5 das Spaltprodukt U3 und aus der Substanz U4 das Spaltprodukt U2 gebildet hatte. Die weitere Auftrennung der Spaltprodukte U2 und U3 erfolgte säulenchromatographisch. Hierbei wurden die Spaltprodukte U2 und U3 kristallin erhalten. Erst in einem weiteren Versuch gelang es, das Gemisch der Substanzen U4 und U5 auch ohne vorherige enzymatische Spaltung an einer Kieselgelfertigsäule zu trennen. Allerdings fielen die Substanzen U4 und U5 nur amorph an.

Tabelle V faßt die Ausbeuten, die Schmelzpunkte und das Verhalten der Substanzen gegenüber 84%iger Schwefelsäure zusammen:

Bezeichnung	Ausbeute	Schmelzpunkte	Farbreaktionen mit 84%iger H_2SO_4
U2		214-218°C	1' gelborange, 2' blutrot, 3' rotviolett, 30' rotviolett, 1h rot, 2h rotgrün, 5h braungrün
U3	0.15-0.2%	252-258°C	1' orange, 3'ocker, 5' braun, 15' violettbraun, 30' flieder, 1h violett
U4	0.25-0.27%	165-175°C	0' gelborange, 1' rotbraun, 2' weinrot, 5' rotviolett, 30' rotviolett, 1h weinrot, 2h rotgrün, 5h braungrün
U5		155°C Blasen 220-225°C bräunlich gefärbt	0' orange, 3' ocker, 5' braun, 30' flieder, 1h violett

3. Substanz U3

3.1. Isolierung der Substanz U3

Die Substanz U3 wurde von den hydrophileren Inhaltsstoffen U4 und U5 durch präparative Säulenchromatographie mit der mobilen Phase Butanol/Toluol/Wasser 4:1:5 (Oberphase) getrennt. Durch Einengen der U3-haltigen Fraktionen, Kristallisation aus Aceton und anschließender Umkristallisation aus Methanol/Äther konnte die Substanz U3 rein in Form farbloser Prismen von konstantem Schmelzpunkt und gleichbleibendem Drehwert erhalten werden. Die Ausbeute betrug 290 mg. Auf die Droge bezogen entspricht dies 0.15%.

3.2. Identifizierung der Substanz U3

Mit der hydrolytischen Spaltung nach MANNICH und SIEWERT (75) konnte der Zucker im PC-, DC-Test und durch DS-Elektrophorese als L-Rhamnose identifiziert werden (siehe 3.2.4.).

3.2.1. Spektrometrische Methoden

Zur Identifizierung der Substanz U3 wurden UV-, IR-, ^{1}H-NMR- und Massenspektren aufgenommen. Aufgrund der positiven Reaktionen mit Kedde- (RI) und Raymond-Reagenz (RII) war bei der Substanz U3 ein Cardenolid zu vermuten. Den Beweis hierfür brachte das UV-Spektrum. Es zeigt ein für den Butenolidring der Cardenolide, einem α,β-ungesättigten Fünfringlacton, charakteristisches Absorptionsmaximum bei der Wellenlänge λ_{max}= 218 nm (MeOH, lg ε = 4.19, ε = 15463) (117). Zieht man die Werte der Ele-

mentaranalyse (C 61.44%, H 8.02%) heran und berücksichtigt man das massenspektrometrisch bestimmte Molekulargewicht des Aglykons (m/e 406) und das Molekulargewicht der L-Rhamnose, so ergibt sich die Summenformel $C_{29}H_{44}O_{11}$ mit den berechneten Werten (C 63.03%, H 8.02%) und ein Molekulargewicht von 552.

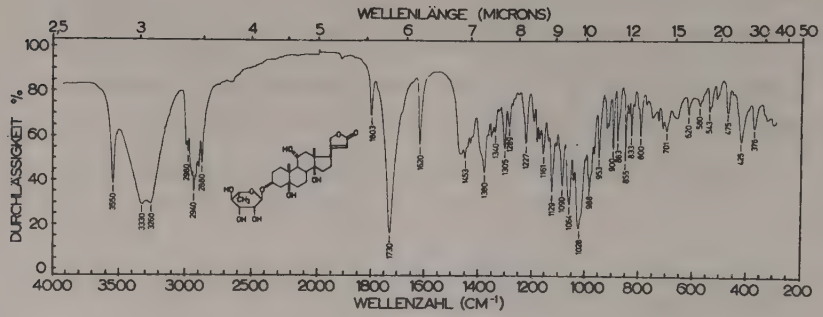


Abb.4 : IR-Absorptionsspektrum der Substanz U3 (LOKUNDJOSID)

Im IR-Spektrum (Abb. 4) fallen die starke Absorptionsbande bei 1730 cm^{-1} und eine schwächere eine 1620 cm^{-1} auf, die ebenfalls typisch für ein α,β-ungesättigtes Fünfringlacton sind.
Die breite Bande im Hydroxylbereich bei 3260-3550 cm^{-1} deutet auf eine oder mehrere freie OH-Gruppen hin, und das Auftreten mehrerer Banden im Bereich 2880-2980 cm^{-1} zeigt das Vorliegen von $\rangle C-$, $\rangle CH_2-$, $-CH_3$-Valenzschwingungen (117) an.
Entscheidende Informationen bezüglich der Position von funktionellen Gruppen, speziell von OH-Gruppen und deren Stereochemie, können dem ^{1}H-NMR-Spektrum entnommen werden (Abb. 5).
Das ^{1}H-NMR-Spektrum der Substanz U3 zeigt zwei scharfe Singuletts bei δ = 1.07 ppm und δ = 1.25 ppm mit der Intensität von

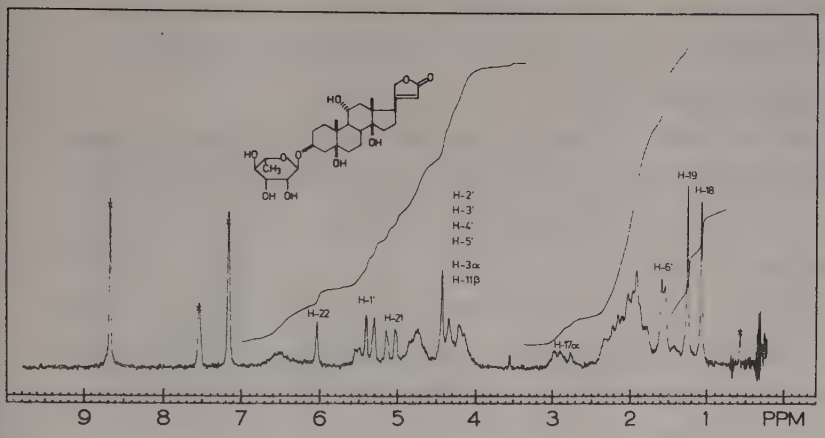


Abb.5 : 100-MHz ^{1}H-NMR-Spektrum der Substanz U3 (LOKUNDJOSID) in d-Pyridin

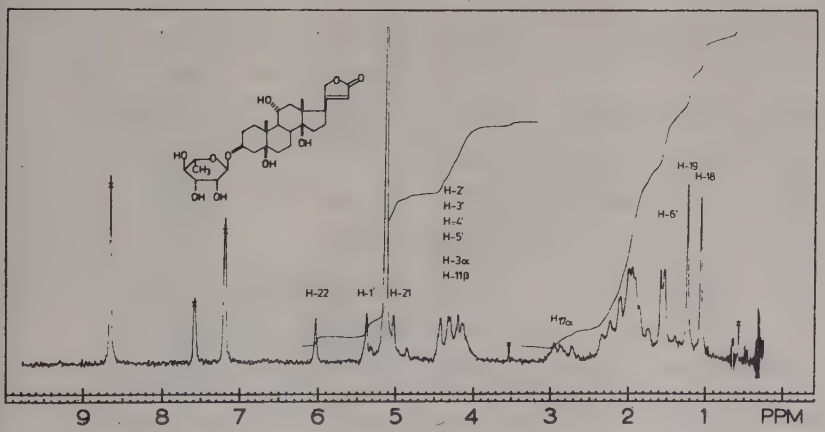


Abb.5 : 100-MHz ^{1}H-NMR-Spektrum der Substanz U3 (LOKUNDJOSID) in d-Pyridin nach H/D-Austausch

je drei Protonen, die aus einem breiten Komplex sich überlagernder Resonanzen im Bereich δ = 1.07-2.40 ppm hervorragen. Dieses Erscheinungsbild ist typisch für anguläre Methylgruppen eines Steroids (6).

Zwischen den beiden Singuletts und dem breiten Signal der Methylengruppen erscheint bei δ = 1.56 ppm (J = 5Hz) ein Dublett (3H), das den drei Protonen an C-6' der Rhamnose zugeordnet werden kann (119).

Die Signale bei δ = 6.04 ppm (t,1H) und δ = 4.98 ppm und 5.20 ppm (q,2H; nach H/D-Austausch dq) zeigen das typische Aufspaltungsmuster eines ABX-Systems wie es die Protonenverteilung im Butenolidring (1 Vinylproton an C-22 und 2 geminale Protonen an C-21) erwarten läßt (16).

Die gefundenen Werte J_{AB}=18 Hz, J_{AX}=2 Hz, J_{BX}=1 Hz stimmen gut mit in der Literatur (16) angegebenen und mit den berechneten Werten überein.

Bei δ = 2.86 ppm erscheint ein Multiplett höherer Ordnung, das einem 17α-Proton eines 5ß,14ß-Cardenolids mit zusätzlicher 14ß-Hydroxylgruppe zugeordnet werden kann. TORI (110) gibt hierfür einen Bereich von δ = 2.83-2.86 ppm an.

Ein schwach verbreitertes Singulett (1H) bei δ = 5.41 ppm kennzeichnet das C-1' Proton der Rhamnose (110).

Ein breites Signal bei δ = 4.14-4.43 ppm (6H) entspricht den Protonen an C-2', C-3', C-4' C-5' der Rhamnose und zwei weiteren Protonen neben OH-Gruppen des Cardenolids, deren exakte Festlegung aufgrund ihrer chemischen Verschiebung nicht möglich ist. Weitere wichtige Informationen, insbesondere über die Anzahl der tatsächlich vorhandenen Hydroxylgruppen können den Massenspektren entnommen werden, wie Abb.6 und Abb.7 zeigen:

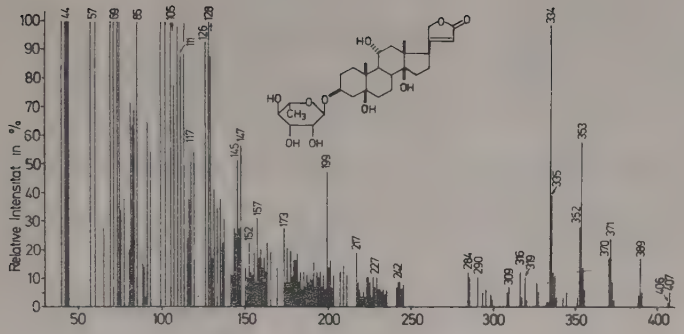


Abb.6 : Ausschnitt aus dem Massenspektrum der Substanz U3 (LOKUNDJOSID) bei 230° Probentemperatur im Massenbereich m/e 30-407

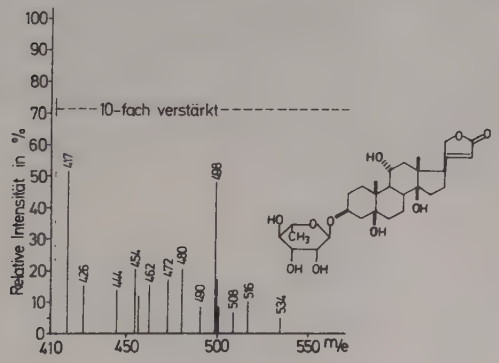


Abb.7 : Ausschnitt aus dem Massenspektrum der Substanz U3 (LOKUNDJOSID) bei 300° Probentemperatur im Massenbereich 410-550

Bei einer Probentemperatur von 300° (Abb.7) fallen im oberen

Massenbereich Ionen auf, die sich durch Abspaltung ein oder mehrerer Moleküle Wasser erklären lassen:

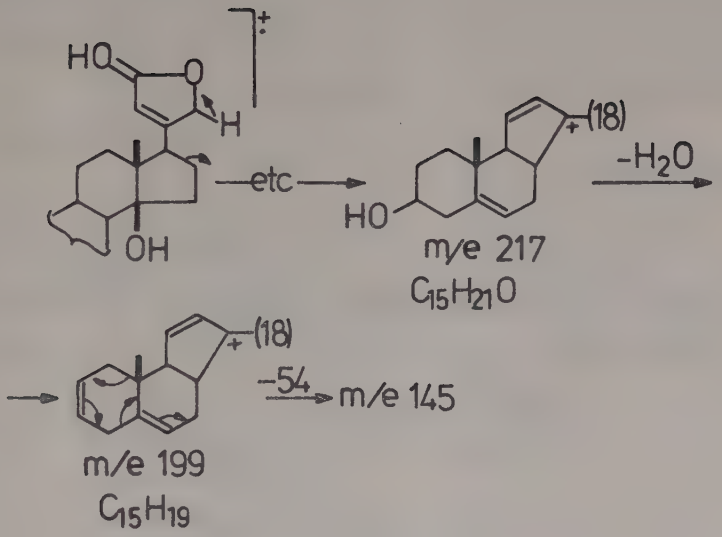
m/e 534 (M^+-H_2O), m/e 516 (M^+-2H_2O),
m/e 498 (M^+-3H_2O), m/e 480 (M^+-4H_2O),
m/e 462 (M^+-5H_2O), m/e 444 (M^+-6H_2O)

Bei einer Probentemperatur von 230° ist im Massenspektrum (Abb.6) der Molekülpeak des Aglykons (m/e 406, 2%) deutlich, aber mit geringer Intensität zu erkennen. Die Anwesenheit von vier Hydroxylgruppen im Aglykon zeigen die mit hoher Intensität auftretenden Fragmente m/e 389 (M^+-H_2O, 17%), m/e 371 ($M+1^+-2H_2O$, 24%), m/e 353 ($M+1^+-3H_2O$, 59%), m/e 334 (M^+-4H_2O, 100%).

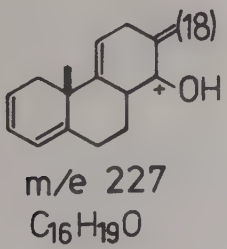
Das Ion m/e 334 läßt sich jedoch auch durch eine Retro-Diels-Alder-Reaktion an Ring A erklären, die durch Hydroxylgruppen an C-3 und C-5 begünstigt ist.(88).

Auffallend sind die starken Peaks bei m/e 199 (48%) und m/e 145 (52%). Nach FAYEZ und NEGM (24,23) entsteht ein C_{15}-Fragment (m/e 199), wenn sich außer der Hydroxylgruppe an C-14 drei weitere Hydroxylgruppen an den Ringen A,B und C befinden, und die Hydroxylgruppe an C-3 später eliminiert wird.

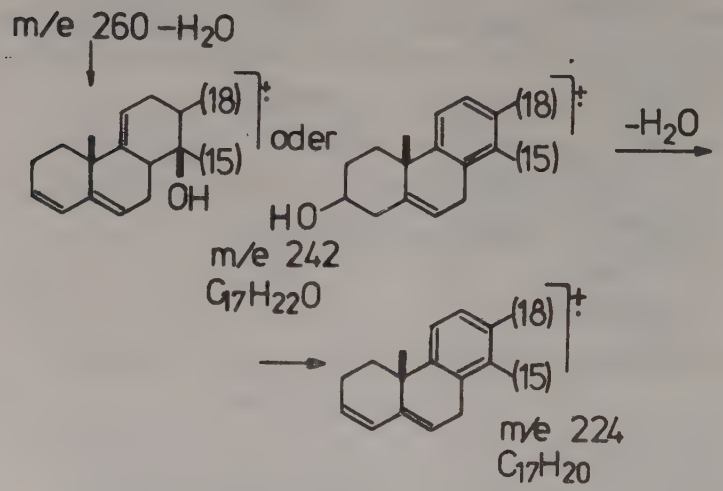
Fragmentierung nach Schema I (FAYEZ):



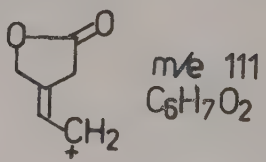
Die Doppelbindung zwischen C-2 und C-3 ermöglicht eine nachfolgende Retro-Diels-Alder-Reaktion, bei der das Fragment m/e 145 (m/e 199-54) entsteht. Der Peak bei m/e 227 (10%) läßt sich nach Schema II (FAYEZ) als ein C_{16}-Fragment formulieren, das nach der Eliminierung aller Substituenten der Ringe A,B und C gebildet wird:



Ein C_{17}-Fragment mit der Massenzahl m/e 224 (10%) entsteht nach Schema III (FAYEZ) durch den teilweisen Verlust des Ringes D,der durch den Bruch der Bindungen zwischen C-13 und C-17 und zwischen C-15 und C-16 hervorgerufen wird:



Für die Anwesenheit des Butenolidringes ist das Bruchstück m/e 111 charakteristisch. Es enthält die Seitenkette sowie C-16, C-17:



Weitere Peaks bei m/e 319, m/e 308 lassen sich folgenden Fragmenten zuordnen:

m/e 319 ($M^+-4H_2O-CH_3$)

m/e 308 ($M^+-3H_2O-CO_2$)

Im unteren Massenbereich sind die auftretenden Ionen bei m/e 147, m/e 128, m/e 117, m/e 102, m/e 73, m/e 60 charakteristisch für L-Rhamnose.

3.2.2. Strukturvorschlag für die Substanz U3

Die bisherige Spektrendiskussion läßt folgenden Schluß zu:
Es handelt sich um ein Glykosid, dessen Zucker L-Rhamnose ist. Das Aglykon trägt einen 17ß-verknüpften Butenolidring und enthält aufgrund der berechneten Doppelbindungsäquivalente keine Doppelbindungen in den Ringen A,B und C. Die Fragmentierung im Massenspektrum zeigt vier Hydroxylgruppen im Aglykon. Die Bildung der Fragmente m/e 242, m/e 227, m/e 217, m/e 199 gibt den Hinweis, daß drei Hydroxylgruppen in den Ringen A,B und C lokalisiert sind, und zwar an C-14, C-3, C-5. Die Lage der vierten Hydroxylgruppe kann zunächst nicht festgelegt werden.
Die beiden Singuletts bei δ= 1.07 ppm und δ= 1.25 ppm des ^{1}H-NMR-Spektrums zeigen zwei anguläre Methylgruppen an C-10 und C-13. Führt man mit den bisherigen Daten die Inkrementberechnung nach TORI (110) durch, so ergeben sich theoretische Werte von δ= 1.13 ppm und δ= 1.25 ppm, die gut mit den gefundenen Werten übereinstimmen.
Offen bleibt die Frage, ob die L-Rhamnose α- oder ß-glykosidisch mit dem Aglykon verbunden ist.

3.2.3. Identifizierung von U3 als LOKUNDJOSID

In der Literatur fand sich ein Cardenolid - genannt LOKUNDJOSID - mit gleicher Summenformel, gleichem Schmelzpunkt und Drehwert

wie sie die Substanz U3 besitzt. Dieses wurde deshalb zum Vergleich herangezogen. Die IR-Spektren der Substanz U3 und dem authentischen LOKUNDJOSID* stimmen vollkommen überein, wie Abb.8 zeigt.

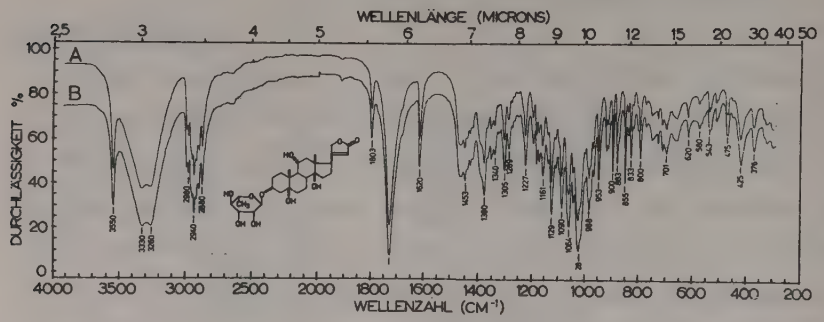


Abb.8 : IR-Absorptionsspektren von Substanz U3 (A) und von authentischem LOKUNDJOSID (B)

Damit ergibt sich, daß die vierte Hydroxylgruppe eindeutig die Position 11α besitzt, und die L-Rhamnose α-glykosidisch mit dem Genin verknüpft ist (25).

Der Mischschmelzpunkt von U3 mit LOKUNDJOSID zeigte keine Depression. Außerdem stimmen in verschiedenen DC-Systemen die Rf-Werte von U3 und LOKUNDJOSID überein.

Somit handelt es sich bei der Substanz U3 um das bereits bekannte LOKUNDJOSID (3ß,5ß,11α,14ß-Tetrahydroxy-card-20(22)-enolid-3-α-L-rhamnopyranosid, Abb.9).

* Ich danke Herrn Professor Dr. T. Reichstein für die Überlassung einer Probe von Lokundjosid.

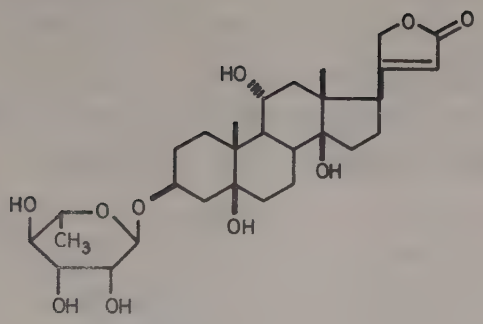


Abb.9 : Formel von LOKUNDJOSID

3.2.4. Spaltung der Substanz U3 nach MANNICH und SIEWERT

Um einen weiteren Beweis für ihre Identität mit LOKUNDJOSID zu erhalten, wurde die Substanz U3 nach MANNICH und SIEWERT (75) hydrolytisch gespalten. Hierbei bildete sich überwiegend U1, das nach Ausschütteln mit Chloroform/Äthanol 2:1 an einer Kieselgelsäule (Laufmittel:Chloroform mit steigendem Methanolgehalt) gereinigt wurde. Die eingeengten U1-haltigen Fraktionen ergaben nach Umkristallisation aus Methanol/Äther 12 mg farblose Prismen mit konstantem Schmelzpunkt 238°C-243°C.

3.2.5. Identifizierung von U1 als BIPINDOGENIN durch Vergleich mit authentischem BIPINDOGENIN

Zur Identifizierung von U1 als BIPINDOGENIN wurden der Mischschmelzpunkt, ein DC-Vergleich und der Vergleich der Massen-

spektren von U1 und authentischem BIPINDOGENIN herangezogen. Der Mischschmelzpunkt zeigte keine Depression und die DC-Analyse in drei verschiedenen Systemen ergab jeweils identische Rf-Werte. Beide Massenspektren (Abb.10 und Abb.11) wiesen Bruchstücke derselben Massenzahlen auf. Die Identität von U1 mit BIPINDOGENIN ist somit eindeutig erwiesen.

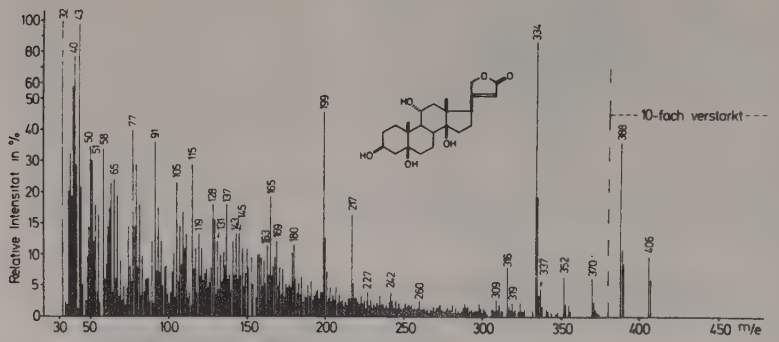


Abb.10 : Massenspektrum von BIPINDOGENIN bei 190° Probentemperatur

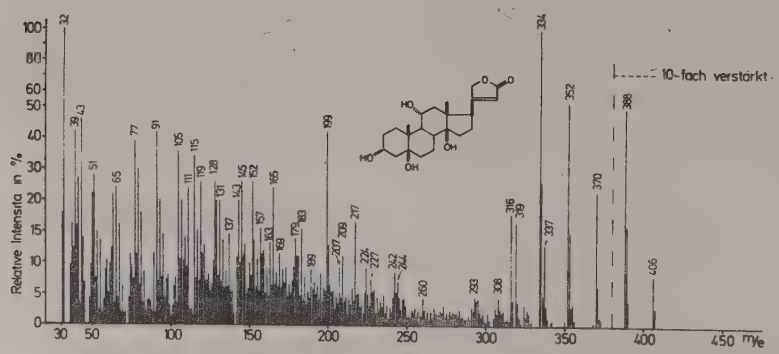


Abb.11 : Massenspektrum von Substanz U1 bei 200° Probentemperatur

4. Substanz U2

4.1. Isolierung der Substanz U2

Das Gemisch der Substanzen U4 und U5, aus dem die Mischfraktion F6 bestand, wurde mit Cellulase, einer ß-Glucosidase, enzymatisch gespalten. Die hierbei gebildeten Spaltprodukte U2 und U3 schüttelte man mit Chloroform/Äthanol 3:1 aus und konnte sie durch erneute Säulenchromatographie (Chloroform/Methanol-Gemisch mit steigender Alkoholkonzentration) voneinander trennen. Hierbei fiel die Substanz U2 fast rein an. Sie kristallisierte aus Methanol/Äther in weißen Nadeln und wies nach mehrfachem Umkristallisieren einen konstant bleibenden Schmelzpunkt von 214°C-218°C auf. Die Ausbeute betrug 152 mg.

4.2. Charakterisierung der Substanz U2

4.2.1. Spektrometrische Methoden

Zur Charakterisierung der Substanz U2 wurden UV-, IR-, ^{1}H-NMR- und Massenspektren aufgenommen.
Auch hier gaben die positiven Reaktionen mit Kedde- (RI) und Raymond-Reagenz (RII) Hinweise auf ein Cardenolid. Den Beweis brachte das UV-Spektrum, welches das für Cardenolide typische Absorptionsmaximum bei der Wellenlänge λ_{max}= 218 nm (MeOH, lgε= 4.16, ε= 14500) aufwies. Aus dem Ergebnis der Elementaranalyse (C 66.19%, H 9.14%) und dem massenspektrometrisch bestimmten Molekulargewicht (M^+ m/e = 422) läßt sich die Summenformel $C_{23}H_{34}O_7$ ableiten.
Im IR-Spektrum (Abb.12) finden sich bei 1616 cm^{-1} und 1752 cm^{-1} die für den Butenolidring charakteristischen Absorptionsbanden,

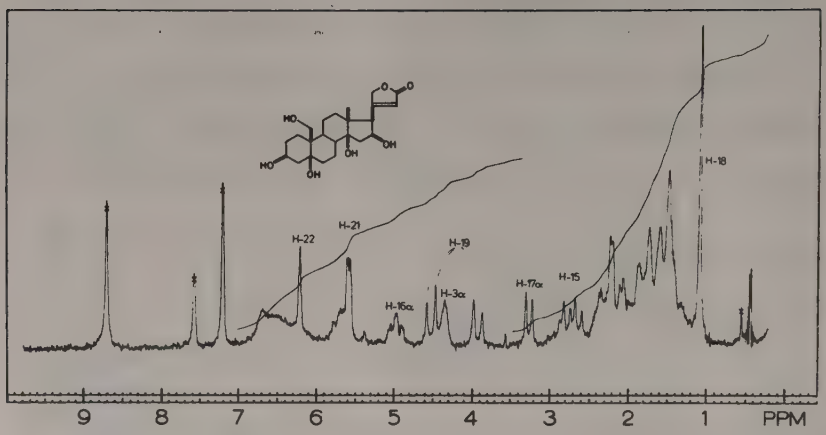


Abb.13 : 100-MHz ^{1}H-NMR-Spektrum der Substanz U2 (16ß-HYDROXY-STROPHANTHIDOL) in d-Pyridin

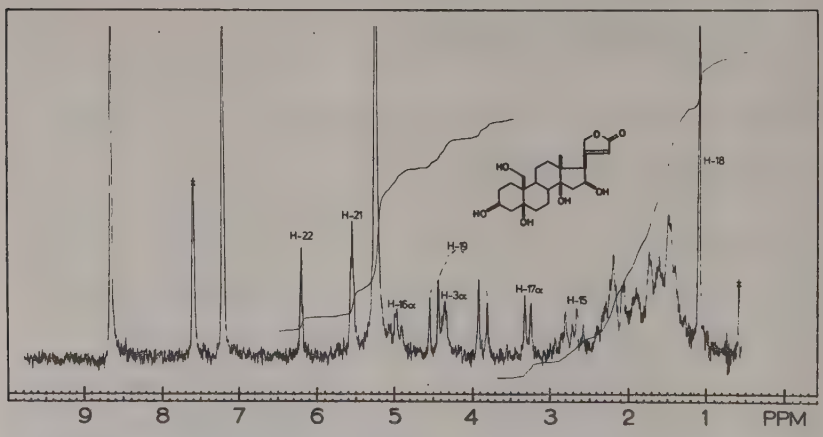


Abb.13 : 100-MHz ^{1}H-NMR-Spektrum der Substanz U2 (16ß-HYDROXY-STROPHANTHIDOL) in d-Pyridin nach H/D-Austausch

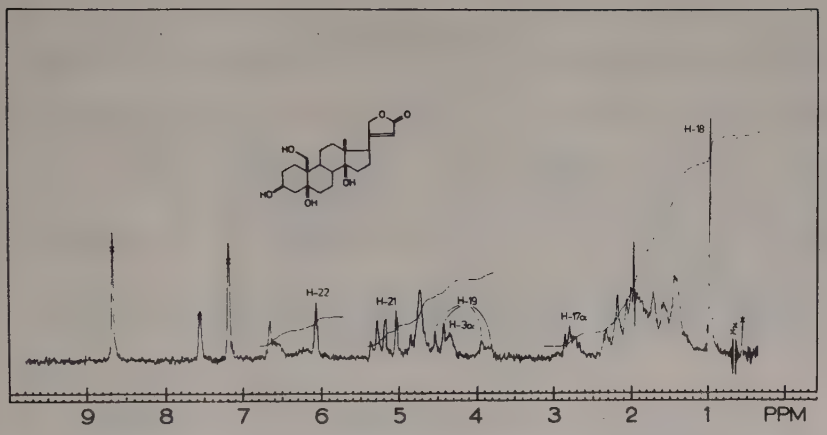


Abb.14 : 100-MHz ^{1}H-NMR-Spektrum von STROPHANTHIDOL in d-Pyridin

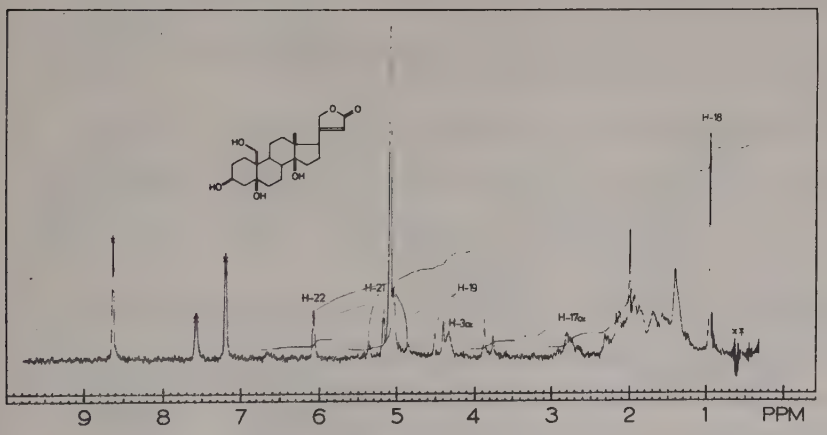


Abb.14 : 100-MHz ^{1}H-NMR-Spektrum von STROPHANTHIDOL in d-Pyridin nach H/D-Austausch

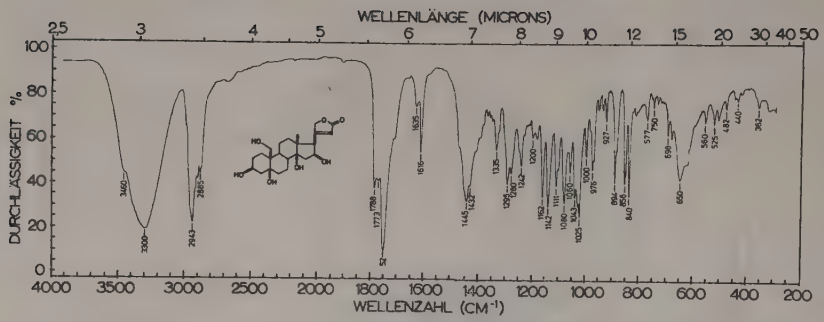


Abb.12 : IR-Absorptionsspektrum der Substanz U2 (16ß-HYDROXY-STROPHANTHIDOL)

im Bereich 3300 cm^{-1} - 3460 cm^{-1} eine breite Bande für freie Hydroxylgruppen und im Bereich 2885 cm^{-1} - 2943 cm^{-1} mehrere Banden, die das Vorliegen eines Kohlenwasserstoffgerüstes anzeigen.

Die entscheidenden Strukturhinweise liefern jedoch die ^{1}H-NMR-Spektren, aus denen in einfacher Weise die Position der OH-Gruppen und deren Stereochemie entnommen werden können. Abb.13 zeigt zwei ^{1}H-NMR-Spektren der Substanz U2.

Auffallend ist, daß im Bereich der angulären Methylgruppen eines Steroids nur ein Signal einer tertiären Methylgruppe bei δ= 1.10 ppm erscheint. Es kann aufgrund seiner chemischen Verschiebung der Methylgruppe an C-13 zugeordnet werden,(110).

Die Signale bei δ= 6.24 ppm (t,1H-22) und δ= 5.54 ppm und 5.67 ppm (q,2H-21) zeigen das Aufspaltungsmuster eines ABX-Systems, wie es die Protonenverteilung im Butenolidring erwarten läßt (J_{AB}=18Hz).

Ein unabhängiges AB-Spektrum bei δ= 3.95 ppm und δ= 4.54 ppm mit einer Kopplungskonstanten von J_{AB}=11Hz, die im Bereich für die Kopplung geminaler Protonen liegt, kann einer Hydroxymethylgruppe an C-10 zugeordnet werden, wie ein ^{1}H-NMR-Spektrenvergleich mit STROPHANTHIDOL zeigt (Abb.14). Das zum Dublett aufgespaltene Signal bei δ= 3.29 ppm (J=8Hz) ist typisch für ein 17α-Proton, wenn die Substanz an C-16 eine Hydroxylgruppe trägt und ein 14ß-Hydroxy-5ß,14ß-cardenolid angenommen wird (110). Die Kopplungskonstante von 8 Hz entspricht nach Karplus der Kopplung von 2 vicinalen Protonen mit kleinem Diederwinkel (6 , 38), somit muß die Hydroxylgruppe an C-16 in ß-Stellung sein.

Das 16α-Protonensignal erscheint in Form eines annähernd doppelten Tripletts bei δ= 5.01 ppm ($w_{1/2}$=10Hz), mit den Kopplungskonstanten J = 8 Hz und J = 2-3 Hz.

Ein ^{1}H-NMR-Vergleich mit GITOXIGENIN, das ebenfalls eine 16ß-OH-Gruppe trägt, zeigt, daß die ppm-Werte der Signale für das 16 - und 17α-Proton gut mit den Werten von U2 übereinstimmen. Außerdem kann aufgrund dieses Vergleiches das breite Signal in Form eines Multipletts bei δ= 2.75 ppm ($w_{1/2}$=15Hz, GITOXIGENIN = 2.75 ppm) den zwei Protonen an C-15 zugeordnet werden. Das Signal eines verbreiterten Singuletts bei δ= 4.37 ppm ($w_{1/2}$=7-8Hz) hat die Lage eines äquatorialen 3α-Protons, wenn eine Hydroxylgruppe an C-5 vorhanden ist, wie ein ^{1}H-NMR-Spektrenvergleich mit STROPHANTHIDOL (Abb.14, δ= 4.37 ppm) und STROPHANTHIDIN (δ= 4.38 ppm) zeigt (vergl. 99).

Ergänzende und bestätigende Informationen liefern auch hier die Massenspektren. Die Abb.15 zeigt das Massenspektrum der Substanz U2 bei einer Probentemperatur von 190°.

Deutlich, aber mit geringer Intensität, ist der Molekülpeak

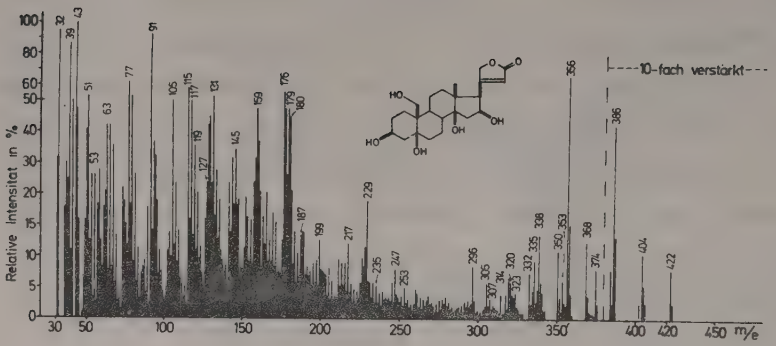


Abb.15 : Massenspektrum der Substanz U2 (16ß-HYDROXY-STROPHANTHIDOL) bei 190° Probentemperatur

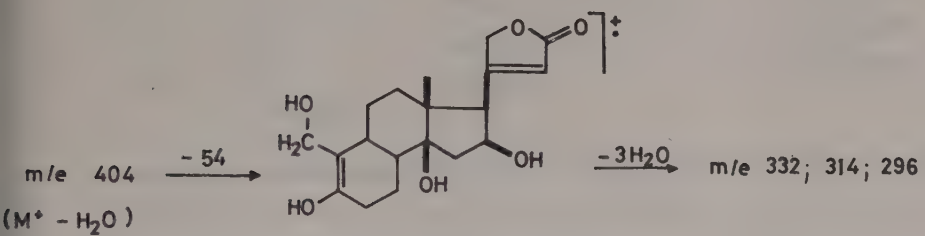
(M^+, m/e 422, 1%) zu erkennen.

Im oberen Massenbereich fallen vier Fragmente mit einer Massendifferenz von jeweils 18 Massen auf, die auf vier Hydroxylgruppen im Molekül hinweisen: m/e 404 (M^+-H_2O, 1%); m/e 386 (M^+-2H_2O, 4%); m/e 368 (M^+-3H_2O, 12%); m/e 350 (M^+-4H_2O, 11%).

Neben der Wasserabspaltung erfolgt die Abspaltung von Formaldehyd (30 Massen): m/e 374 ($M^+-H_2O - CH_2O$, 8%); m/e 356 ($M^+-2H_2O-CH_2O$, 66%); m/e 338 ($M^+-3H_2O - CH_2O$, 13%); m/e 320 ($M^+-4H_2O-CH_2O$, 6%), und die Abspaltung einer Methylgruppe m/e 353 ($M^+-3H_2O - CH_3$, 6%); m/e 335 ($M^+-4H_2O - CH_3$, 9%); m/e 323 ($M^+-3H_2O-CH_2O - CH_3$, 4%); m/e 305 ($M^+-4H_2O - CH_2O - CH_3$, 6%), die das Vorliegen einer Hydroxymethyl-Gruppierung und einer angulären Methylgruppe bestätigen.

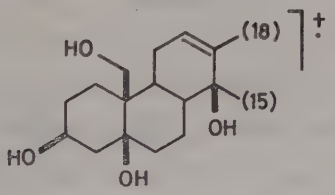
Der intensivste Peak im oberen Bereich des Massenspektrums ist der des Ions m/e 356 (66%).

Die Bruchstücke mit den Massenzahlen m/e 350 (11%) und m/e 296 (8%) lassen sich durch eine Retro-Diels-Alder-Reaktion an Ring A erklären, die durch Hydroxylgruppen an C-3 und C-5 begünstigt ist (88,9).



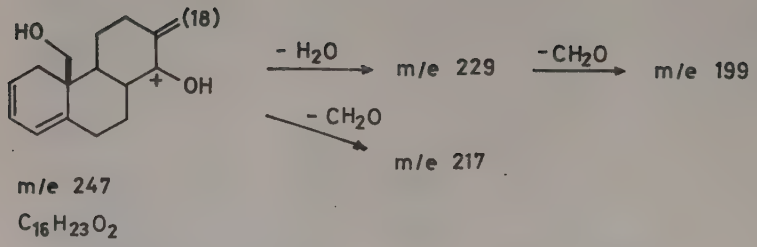
m/e 350 ($C_{19}H_{26}O_6$)

Das Ion der Massenzahl m/e 296 ließe sich jedoch auch als ein C_{17}-Fragment nach Schema III (FAYEZ) formulieren:



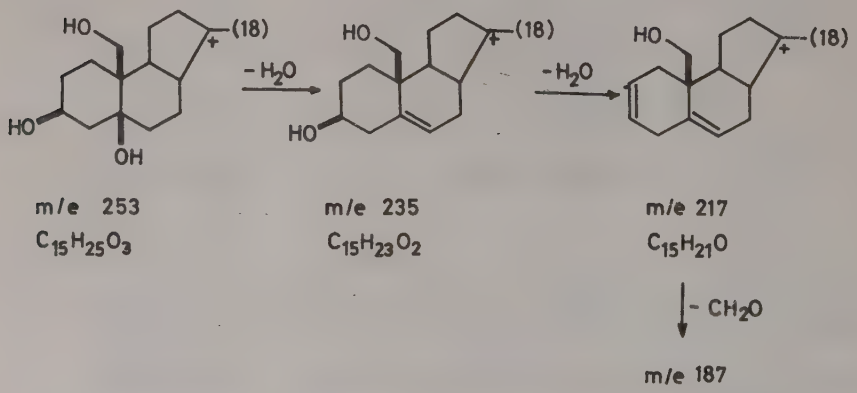
m/e 296 ($C_{17}H_{28}O_4$)

Der mit hoher Intensität auftretende Peak bei m/e 229 (19%) deutet nach Schema II (FAYEZ) auf ein C_{16}-Fragment hin, das sich nach Eliminierung aller Substituenten an den Ringen A,B und C bildet:



Durch weitere Abspaltung von Formaldehyd und Wasser entstehen folgende Fragmente: m/e 217 (m/e 247 - CH_2O, 12%) und m/e 199 (m/e 247 - H_2O - CH_2O, 13%).

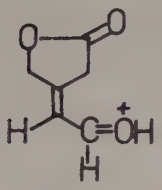
Das Ion der Massenzahl m/e 217 (12%) läßt sich auch als C_{15}-Fragment nach Schema I (FAYEZ) erklären, wenn sich außer der 14ß-Hydroxylgruppe drei weitere OH-Gruppen in den Ringen A,B und C befinden:



Der Peak m/e 187, der durch nochmalige Abspaltung von Formaldehyd aus m/e 217 entsteht, ist nach RASHKES (88) typisch für Substanzen, die an C-10 einen sauerstoffhaltigen Substituenten

tragen.

Charakteristisch für Substanzen, die in 16-Stellung eine Hydroxylgruppe haben, ist das Bruchstück m/e 127 (24%):



m/e 127
$C_6H_7O_3$

4.2.2. Strukturvorschlag für die Substanz U2

Die Interpretation der Spektren führt zu folgendem Ergebnis: Die Substanz U2 stellt ein Cardenolid mit einem 17ß-Butenolidring dar. Das ^{1}H-NMR-Spektrum zeigt die Anwesenheit einer angulären Methylgruppe an C-13 und einer Hydroxymethylgruppe an C-10, was die wiederholten Abspaltungen von Formaldehyd und Methyl im Massenspektrum bestätigen.

Die vier Hydroxylgruppen befinden sich in 3ß-,5ß-,14ß- und 16ß-Stellung. Führt man mit diesen Daten die Inkrementberechnung nach TORI (110) durch, so stimmt der theoretische Wert (δ = 1.16 ppm) für die Methylgruppe an C-13 gut mit dem gefundenen Wert überein.

Diese Übereinstimmung ist gleichzeitig ein Beweis für die Richtigkeit der Position der vier Hydroxylgruppen.

Die aufgeführten spektrometrischen Daten zeigen auf, daß die Substanz U2 die Struktur von 16ß-HYDROXY-STROPHANTHIDOL besitzt.

Die Substanz U2 (3ß,5ß,14ß,16ß,19-Pentahydroxy-card-20(22)-enolid, Abb.16) stellt ein bisher unbekanntes Cardenolid dar.

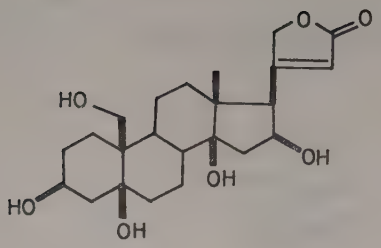


Abb.16 : Formel von 16ß-HYDROXY-STROPHANTHIDOL (3ß,5ß,14ß,16ß, 19-Pentahydroxy-card-20(22)-enolid)

4.2.3. Acetylierung der Substanz U2

Die Substanz U2 enthält zwei tertiäre Hydroxylgruppen an C-5 und C-14, die einer normalen Acetylierung mit Essigsäureanhydrid in Pyridin nicht zugänglich sind. Deshalb wurde die drastischere Methode nach HÖFLE und STEGLICH (42) mit Essigsäureanhydrid in Gegenwart von 4-Pyrrolidinopyridin als Katalysator gewählt, um Acetylierung aller fünf Hydroxylgruppen zu erreichen.
Die DC-Prüfung in Chloroform/Methanol 9:1 zeigte, daß sich nach 12h das Ausgangsprodukt vollständig umgesetzt hatte.
Nach der Aufarbeitung (experim. Teil 4.4.1.) wurden 6 mg des Reaktionsproduktes erhalten.

4.2.3.1. Charakterisierung des O-Acetyl-derivates der Substanz U2

Die Aufnahme eines 90 MHz-^{1}H-NMR-Spektrums (Abb.17) zeigt deut-

lich ein Singulett bei δ= 1.26 ppm, das der angulären Methylgruppe an C-13 entspricht. Sie zeigt weiterhin ein breites Signal mit fünf Spitzen bei δ= 2.00 - 2.21 ppm mit der Intensität von 15 Protonen, die ein Beweis für die erwarteten fünf Acetoxy-Gruppen von 16ß-HYDROXY-STROPHANTHIDOL sind. Das Singulett bei δ= 6.03 ppm (1H-22) kann dem Vinylproton an C-22 zugeordnet werden.

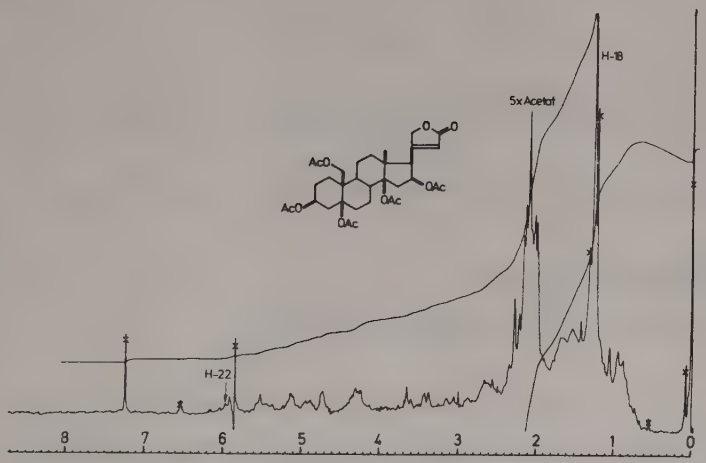


Abb.17 : 90-MHz ^{1}H-NMR-Spektrum der Substanz U2-Penta-acetat in $CDCl_3$

Vergleicht man das IR-Spektrum der Substanz U2-Acetat mit dem der Substanz U2, so zeigt sich, daß im Bereich der Hydroxylgruppen die Bande fast vollständig verschwunden ist.(Abb.18). Hieraus folgt, daß es sich bei der Substanz U2-Acetat um das Penta-O-acetyl-derivat von 16ß-HYDROXY-STROPHANTHIDOL handelt.

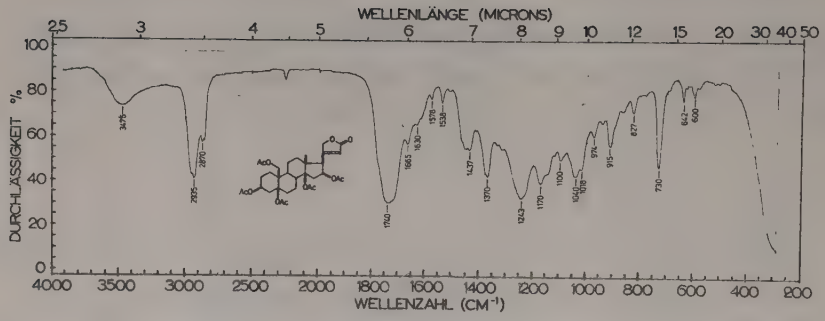


Abb.18 : IR-Absorptionsspektrum der Substanz U2-Penta-acetat

5. Substanzen U4 und U5

5.1. Isolierung der Substanzen U4 und U5

Die Substanzen U4 und U5 wurden aus der Mischfraktion F6 (U4, U5) ohne vorherige enzymatische Spaltung in einem zweiten Versuch durch Chromatographie an einer Kieselgelfertigsäule mit dem Fließmittel Chloroform/Methanol 95:5 in chromatographisch reiner Form erhalten. Es gelang jedoch nicht, sie zur Kristallisation zu bringen. Die Ausbeuten betrugen 96 mg U4 und 79 mg U5.

5.2. Charakterisierung der Substanz U4

5.2.1. Spaltung der Substanz U4

Die enzymatische Spaltung der Substanz U4 mit Cellulase und die Identifizierung der Spaltprodukte ergab U2 - 16ß-HYDROXY-STROPHANTHIDOL - und D-Glucose (siehe 4.1.). Bei der genuinen Sub-

stanz U4 handelt es sich somit mit großer Wahrscheinlichkeit um 16ß-HYDROXY-STROPHANTHIDOL-3-ß-D-GLUCOPYRANOSID.

5.2.2. Spektrometrische Methoden

Im UV-Spektrum findet sich das Absorptionsmaximum bei der Wellenlänge λ_{max}=218 nm (MeOH, lg ε = 4.12) und im IR-Spektrum (Abb.19) ragen die Absorptionsbanden bei 1627 cm^{-1} und 1733 cm^{-1}, bei 2890 - 2940 cm^{-1} und bei 3340 cm^{-1} heraus, die charakteristisch für den 16ß-HYDROXY-STROPHANTHIDOL-Teil sind.

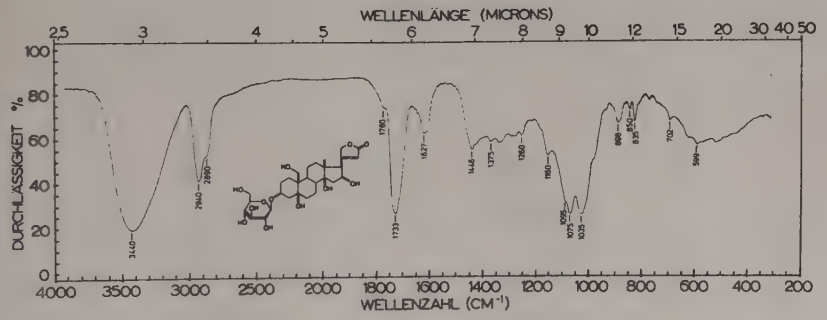


Abb.19 : IR-Absorptionsspektrum der Substanz U4 (16ß-HYDROXY-STROPHANTHIDOL-3-ß-D-GLUCOPYRANOSID)

Auch im ^{1}H-NMR-Spektrum (Abb.20) lassen sich leicht die Signale zuordnen, die vom Aglykon herrühren.
Der Butenolidring ist an den Protonensignalen bei 6.13 ppm (1H-22,s) und 5.30 - 5.71 ppm (2H-21, q, J_{AB}=18 Hz, ν_A=557.8 Hz, ν_B=542.5 Hz) zu erkennen, während wiederum das typische Dublett bei 3.21 ppm (J=8 Hz) dem 17α-Proton und das breite Multiplett

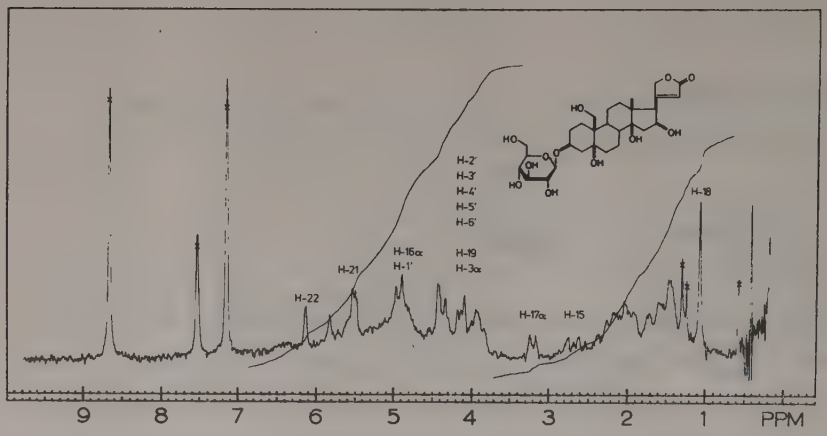


Abb.20 : 100-MHz ^{1}H-NMR-Spektrum der Substanz U4 (16ß-HYDROXY-STROPHANTHIDOL-3-ß-D-GLUCOPYRANOSID) in d-Pyridin

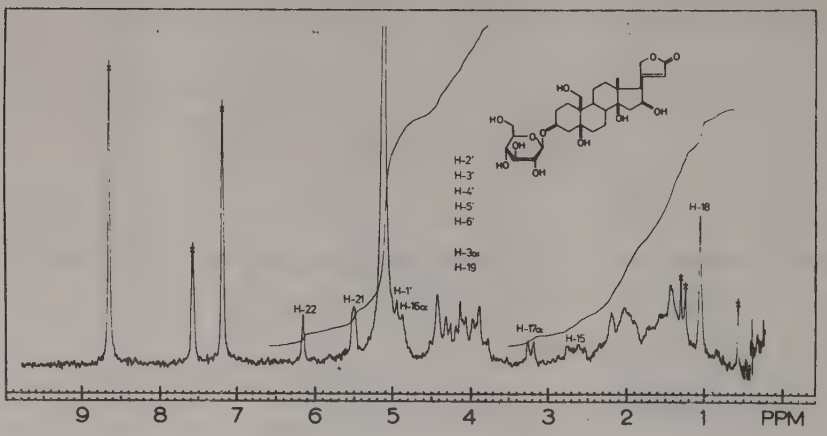


Abb.20 : 100-MHz ^{1}H-NMR-Spektrum der Substanz U4 (16ß-HYDROXY-STROPHANTHIDOL-3-ß-D-GLUCOPYRANOSID) in d-Pyridin nach H/D-Austausch

bei δ= 2.74 ppm den zwei Protonen an C-15 zugeordnet werden kann.

Der breite Komplex sich überlagender Resonanzen im Bereich von 3.84 - 4.54 ppm mit der Intensität 8H wird durch die drei Protonen an C-3 und C-19 des Aglykons und die fünf Protonen der D-Glucose an C-2', C-3', C-4', C-5' und C-6' (119) hervorgerufen.

Das 16α-Proton des Aglykons erscheint bei tieferem Feld bei δ= 4.90 ppm wie es auch das ^{1}H-NMR-Spektrum der Substanz U2 zeigt, wird jedoch hier von dem Dublett δ= 4.94 ppm (J=8 Hz) des anomeren Protons der D-Glucose teilweise überlagert.

Die beim anomeren Proton (Abb.21) beobachtete Kopplungskonstante von 8 Hz wird durch die vicinale Kopplung zweier axial-axial zueinanderstehender Protonen verursacht.(119).

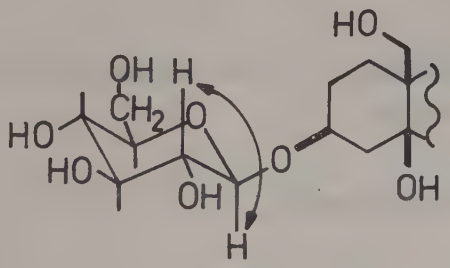


Abb.21

Diese axial-axiale Kopplung des anomeren Protons zeigt eindeutig, daß das 16ß-HYDROXY-STROPHANTHIDOL ß-glykosidisch mit dem Zucker verknüpft ist. Ein weiterer Beweis dafür ist auch die Spaltbarkeit der Substanz U4 mit einer Cellulase, d.h. einer ß-Glucosidase.

Die Struktur der Substanz U4 als 16ß-HYDROXY-STROPHANTHIDOL-

3-ß-D-GLUCOPYRANOSID (Abb.22) ist damit bewiesen. Es handelt sich um ein neues genuines Cardenolid, das bisher weder in der Gattung ERYSIMUM noch in anderen Gattungen und Familien beschrieben wurde. Nach FAVARGER (22), der sich als Botaniker um die Systematik der Gattung ERYSIMUM besonders verdient gemacht hat und die vorliegende Art, ERYSIMUM DECUMBENS Dennst., eingehend beschrieben hat, schlagen wir für dieses neue Herzglykosid den Namen " FAVARGOSID " vor.

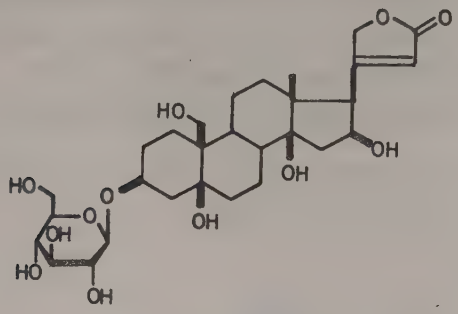


Abb.22 : Formel von FAVARGOSID (16ß-HYDROXY-STROPHANTHIDOL-3-ß-D-GLUCOPYRANOSID)

5.2.3. Acetylierung der Substanz U4

Durch Acetylierung mit Essigsäureanhydrid in Pyridin, bei der alle primären und sekundären Hydroxylgruppen verestert werden, sollten bei der Substanz U4 sechs Acetoxy-Gruppen zu erwarten sein. Nach 24-stündigem Stehen bei Zimmertemperatur war die Ausgangssubstanz vollständig umgesetzt, eine Kristallisation des Reaktionsproduktes gelang jedoch nicht. Die Ausbeute betrug 13 mg U4-Acetat.

5.2.3.1. Charakterisierung der acetylierten Substanz U4

Spektrometrische Methoden

Es wurden ^{1}H-NMR-, IR- und Massenspektren aufgenommen. Im ^{1}H-NMR-Spektrum (Abb.23) erscheint das Signal der angulären Methylgruppe bei δ = 1.26 ppm (3H), wie es auch die Substanz U2-Penta-acetat in Abb.17 zeigt. Das breite Signal mit fünf Spitzen im Bereich 2.00 - 2.11 ppm hat die Intensität von 18 Protonen, die der Protonenzahl von sechs Acetoxy-Gruppen entspricht.

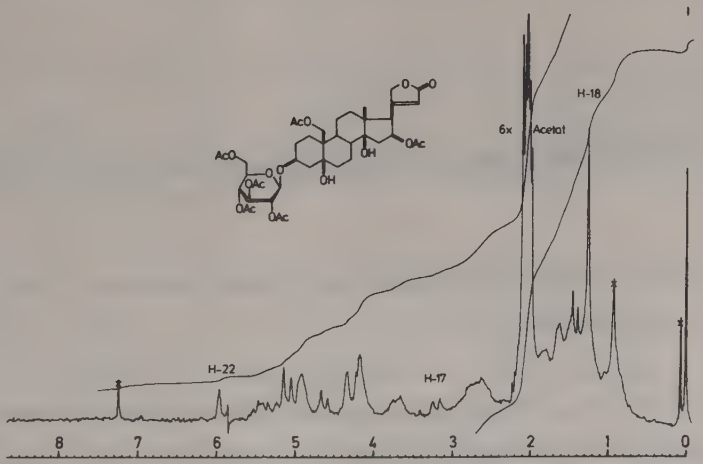


Abb.23 : 90-MHz ^{1}H-NMR-Spektrum der Substanz U4-Hexa-acetat in $CDCl_3$

Das Vorliegen von sechs Acetoxy-Gruppen wird auch durch das Massenspektrum (Abb.24) bestätigt. Der höchste Peak m/e 740 (M^+-60-H_2O) und weitere Fragmente im oberen Massenbereich fallen durch wiederholte Abspaltungen von Essigsäure (60 Masseneinheiten) und Keten (42 Masseneinheiten) auf.

Das Ion m/e 459 (1%) ist z.B. nach Abspaltung von sechs Molekülen Essigsäure und einem Molekül Wasser erklärbar.
Außerdem treten im unteren Massenbereich die typischen Fragmente m/e 331, m/e 271, m/e 229, m/e 211, m/e 169, m/e 127 und m/e 109 der acetylierten Glucose auf (41,10).

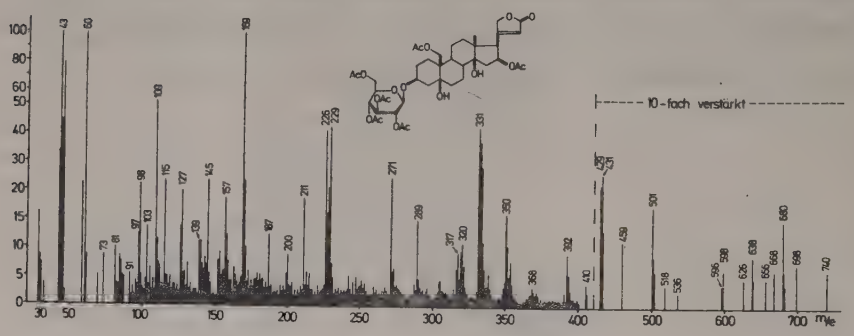


Abb.24 : Massenspektrum der Substanz U4-Hexa-acetat bei 250° Probentemperatur

Vergleicht man die IR-Spektren der acetylierten (Abb.25) und nichtacetylierten Substanz U4 (Abb.19), so zeigt sich im Bereich von von 3100 cm^{-1} - 3500 cm^{-1}, daß die Zahl der freien Hydroxyl-Gruppen abgenommen hat, jedoch noch freie Hydroxyl-Gruppen (tertiäre OH-Gruppen) vorhanden sind.
Durch diese Daten ist das Vorliegen von HEXA-O-ACETYL-FAVARGOSID bestätigt.

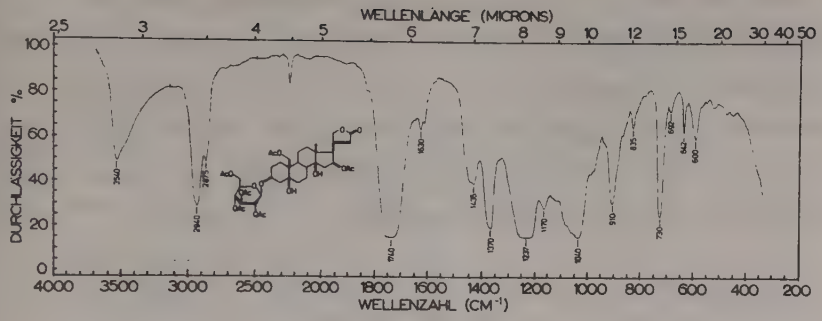


Abb.25 : IR-Absorptionsspektrum der Substanz U4-Hexa-acetat

5.3. Charakterisierung der Substanz U5

5.3.1. Spaltung von U5

Die Substanz U5 wurde einmal nach MANNICH und SIEWERT (75) hydrolytisch gespalten. Nach Ausschütteln der Substanz U1 mit Chloroform/Äthanol 2:1 wurde die wäßrige Phase eingeengt und an 10 g Cellulosepulver mit Butanol/Äthanol/Wasser 4:1:1 als mobile Phase chromatographiert. Die Zucker enthaltenden Fraktionen konnten im DC-, PC-Test und im Elektropherogramm durch direkten Vergleich als D-Glucose und L-Rhamnose - wie im experimentellen Teil näher ausgeführt wird - identifiziert werden.

Enzymatische Spaltung mit Cellulase, einer ß-Glucosidase, ergab die Substanz U3 und D-Glucose.

5.3.2. Spektrometrische Methoden

Es wurden nur das UV- und IR-Spektrum aufgenommen. Das UV-Spektrum der Substanz U5 zeigt das charakteristische Absorptionsmaximum bei λ_{max}=215 nm (ε = 14045, lg ε = 4.15) und das IR-Spektrum (Abb.26) die typischen Banden für den Butenolidring (1625 cm^{-1}, 1735 cm^{-1}), freie Hydroxylgruppen (3400 cm^{-1}) und $\rangle C-$, $\rangle CH_2$, $-CH_3$-Valenzschwingungen.

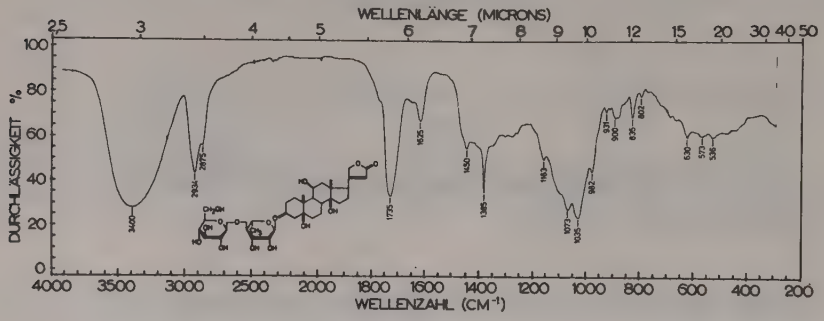


Abb.26 : IR-Absorptionsspektrum der Substanz U5 (GLUCO-LOKUNDJOSID)

5.3.3. Strukturvorschlag für die Substanz U5

Die hydrolytische und enzymatische Spaltung der Substanz U5, die Identifizierung der Spaltprodukte und die spektrometrischen Daten zeigen die Identität der Substanz U5 mit GLUCO-LOKUNDJOSID (Abb.27, MG: 714.8; $C_{35}H_{54}O_{15}$). Die Glucose ist ß-glykosidisch gebunden. GLUCO-LOKUNDJOSID (3ß,5ß,11α,14ß-Tetrahydroxycard-20(22)-enolid-3ß-O-[O-ß-D-glucopyranosyl-(1 → 4)]-α-L-

rhamnopyranosid) ist in der Literatur bisher noch nicht beschrieben worden.

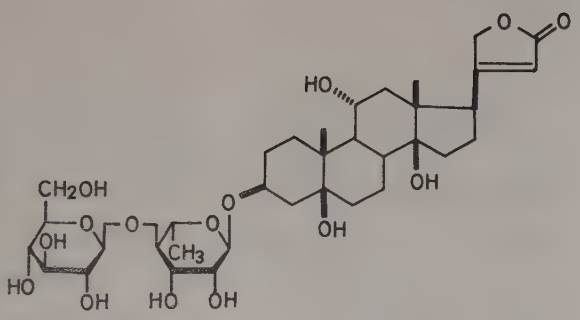


Abb.27 : Formel von GLUCO-LOKUNDJOSID

VI. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

E X P E R I M E N T E L L E R T E I L

A. Allgemeine Angaben

1. Chromatographie

Zur Dünnschichtchromatographie wurden DC-Fertigplatten Kieselgel F Woelm und Kieselgel F_{254} Merck von 20 x 20 cm Größe verwendet. Zur Papierchromatographie fanden die Papiere der Firma Machery und Nagel Nr. 214 und Nr. 260 Verwendung. Es wurde aufsteigend entwickelt. Zur Adsorptionschromatographie in Säulen wurden Kieselgel Woelm (Ø 0,05-0,2 mm) und Merck Fertigsäulen (Kieselgel 160, Größe B) verwendet. Ionenaustauschchromatographie erfolgte in Säulen mit dem stark basischen Harztyp Dowex 1X2 (Chloridform). Die Angaben der Mischungsverhältnisse bei Fließmitteln beziehen sich auf Volumina (v/v).

2. Detektion spezifischer Stoffgruppen erfolgte mit folgenden Sprühreagentien

Cardenolide:

R I Kedde-Reagenz (47): 1g 3,5-Dinitrobenzoesäure wird in einer Mischung aus 50 ml Methanol und 50 ml wäßriger 2n-KOH gelöst.

R II Raymond-Reagenz (103): Sprühlösung I 10%ige wäßrige 1,3-Dinitrobenzollösung in Benzol

Sprühlösung II 6 g NaOH werden in 25 ml Wasser gelöst und mit 45 ml Methanol versetzt.

Mit I besprühen, bei 60°C trocknen und mit II nachsprühen.

R III Vanillin/Phosphorsäure-Reagenz (78): 1 g Vanillin wird in 100 ml eines Gemisches aus 80 ml Äthanol und 20 ml 84%iger Phosphorsäure gelöst. Besprühen und 10–20 min. Erhitzen auf 120°C bis Fleckenbildung eintritt.

R IV Vanillin/Schwefelsäure-Reagenz (111): 1 g Vanillin wird in 100 ml eines Gemisches aus 80 ml Äthanol und 20 ml konz. Schwefelsäure gelöst. Kurzes Erhitzen auf 120°C bis Fleckenbildung eintritt.

Zucker:

R V Anilinphthalat-Reagenz (83): 0.93 g Anilin und 1.66 g Phthalsäure werden in 100 ml wassergesättigtem n-Butanol gelöst. Besprühen und 10 min. Erhitzen auf 105°C.

R VI Thymol/Schwefelsäure-Reagenz (103): 0.5 g Thymol wird in 95 ml Äthanol gelöst und mit 5 ml konz. Schwefelsäure versetzt. Besprühen und 15-20 min. Erhitzen auf 120°C bis Fleckenbildung erfolgt.

Glucosinolate:

R VII Ammoniakalische Silbernitratlösung (94): (nur für PC)
20 ml einer 1%igen $AgNO_3$-Lösung werden mit 5 ml konz. Ammoniak-Lösung gemischt. Zweimaliges Besprühen, zweimaliges Erhitzen auf 120°C für 8 Minuten, Auswaschen des PC in verdünnter HNO_3-Lösung (1%) und Trocknen unter Lichtausschluß.

3. Elektrophorese

Die Dünnschichtelektrophorese wurde mit dem DS-Elektrophoresegerät der Firma CAMAG auf DC-Platten mit Kieselgel- oder Cellulose-Pulverschichten durchgeführt.

4. Schmelzpunktbestimmungen

Die Schmelzpunkte wurden mit dem Kofler-Heiztischmikroskop bestimmt, sie sind nicht korrigiert.

5. Mikroanalysen

Die Mikroanalysen wurden im Mikroanalytischen Labor I. Beetz, 8640 Kronach, durchgeführt.

6. UV-Spektrometrie

Die Absorptionsspektren wurden mit einem Spektrometer vom Typ CARRY 14 aufgenommen. Die Schichtdicke der Quarzküvetten betrug 1 cm. Als Lösungsmittel wurde Methanol verwendet.

7. IR-Spektrometrie

Die IR-Spektren wurden mit einem PERKIN ELMER 621-Spektralphotometer in KBr-Preßlingen aufgenommen.

8. ^{1}H-NMR-Spektrometrie

Die Kernresonanzspektren wurden mit dem Spektrometer VARIAN HA 100 und BRUCKER HX 90 aufgenommen. Lösungsmittel war d-Pyridin. Tetramethylsilan diente als interner Standard. Alle Angaben von ppm-Werten erfolgen in [δ] .

9. Massenspektren

Die Massenspektren wurden mit dem Massenspektrometer CH4 VARIAN MAT aufgenommen.

10. Optische Drehung

Die Messung der optischen Drehung erfolgte mit dem lichtelektrischen Präzisions-Polarimeter LEP A2 Zeiss 0.005°.

B. Spezielle Angaben

1. Herkunft des Pflanzenmaterials

a) 350 g Samen von ERYSIMUM DECUMBENS Dennst. standen zur Verfügung. Die Samen waren von Prof. Favarger (Jura neuchâtelois) gesammelt worden.

b) 5 g Samen davon wurden im Sommer 1972 bei der Firma Borntträger, Offstein, erneut zur Aussaat gebracht. Im Herbst 1973 erhielten wir dadurch weitere 400 g Samen. Einige Pflanzenexemplare wurden uns zum Zeitpunkt der Blüte übersandt und als Herbarmaterial im Institut für Pharmakognosie und Phytochemie deponiert.

2. Extraktion der Samen

Je 200 g fein gemahlene Samen wurden bei Raumtemperatur 3mal mit je 1400 ml Petroläther entfettet. Das entfettete und getrocknete Samenpulver (132 g) wurde 3mal mit je 1400 ml 70%igem Methanol am Rückfluß gekocht.

Die vereinigten filtrierten Extraktlösungen wurden im Vakuum auf 500 ml eingeengt und mit destilliertem Wasser auf 2000 ml aufgefüllt. Diese wäßrige Lösung wurde durch eine Schicht Hyflo (Hyflo-Supercel der Firma Serva, Heidelberg) klar filtriert und anschließend durch eine Säule (Ø 2.5 cm) mit 200 ml Dowex 1X2 (50 mesh, Chloridform) geschickt. Die Harzsäule wurde mit 1500 ml Wasser nachgewaschen. Der Durchlauf und die Waschflüssigkeit wurden vereinigt und für die Gewinnung der Herzglykoside (siehe Isolierung von U3,U4,U5) verwendet.

3. Isolierung eines Glucosinolats als Kalium-Salz

Die Ablösung des Glucosinolats vom Harz erfolgte mit 5%iger Kaliumsulfatlösung. Das Eluat wurde in Fraktionen zu je 250 ml pro 20 Min. aufgefangen. Laut DC-Prüfung in dem Laufmittel Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:5 (Oberphase, Sprühreagenz R VII) und Myrosinase-Test (1 ml Lösung wird mit 1 ml Phosphatpuffer pH 7 gemischt. Man gibt 5-10 Tropfen Myrosinaselösung und Ascorbinsäure zu. Nach wenigen Minuten tritt eine opaleszierende Trübung auf.) enthielten die Fraktionen 8-26 das gesuchte Glucosinolat.
Die Fraktionen 8-26 wurden im Vakuum eingedampft. Der Trockenrückstand wurde 3mal mit je 50 ml heißem 85%igem Äthanol kräftig durchgeschüttelt. Die heißen Extraktlösungen wurden sofort durch eine Glasfritte filtriert, wobei farbloses K_2SO_4 als Rückstand auf dem Filter blieb. Aus der Lösung schieden sich beim Erkalten weiße, feine Nadeln ab. Nach zweitägigem Stehen im Kühlschrank wurden sie abgesaugt und getrocknet. 2maliges Umkristallisieren aus 85%igem Äthanol ergab 2.65 g GLUCOIBERIN, entsprechend 1.3 % Gehalt in den Samen.

3.1. Eigenschaften von GLUCOIBERIN

Schmelzpunkt: 136°C - 140°C

Mischschmelzpunkt mit authentischem GLUCOIBERIN, das aus Samen von Iberis amara L. isoliert worden war, ergab keine Schmelzpunktdepression.

IR-Spektren von GLUCOIBERIN (A) und authentischem GLUCOIBERIN (B) waren identisch: (0.90 mg, 150 mg KBr)

$[cm^{-1}]$: 604, 685, 768, 791, 866, 945, 975, 1031, 1046, 1087, 1126, 1215, 1260, 1304, 1410, 1426, 1562, 1650, 2898, 2920, 2962, 3004, 3334, 3433, 3494.

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -55.2^\circ$ (c 4.922; Wasser)

4. Isolierung der Substanzen U2 (16ß-HYDROXY-STROPHANTHIDOL), U3 (LOKUNDJOSID), U4 (FAVARGOSID) und U5 (GLUCO-LOKUNDJOSID)

Der auf 500 ml eingeengte wäßrige Durchlauf wurde 7mal mit je 200 ml Chloroform/Äthanol 3:1 und 7mal mit je 200 ml Butanol ausgeschüttelt. Die organischen Phasen wurden mit 5%iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und anschließend mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeengt. Die so vorgereinigten und angereicherten Fraktionen wurden auf DC-Platten mit den Laufmitteln I (Chloroform/Methanol 7:3) und II (Butanol/Toluol/Wasser 4:1:1) chromatographiert.
Sie enthielten laut DC-Analyse (Sprühreagentien R I, R II, R III, R IV) die gleichen Inhaltsstoffe und wurden deshalb vereinigt.
Gesamtmenge der Cardenolid-Rohfraktion 2.94 g

4.1. Isolierung von U3 (LOKUNDJOSID)

2.94 g Cardenolid-Rohfraktion wurden in wenig Methanol aufgenommen und die Lösung mit 5 g Kieselgel verrieben. Das Gemisch wurde getrocknet und fein zerrieben auf eine Säule mit 600 g Kieselgel, das mit 60 ml Unterphase eines Butanol/Toluol/Wasser-Gemisches 4:1:5 durchtränkt war, gebracht. Es wurde mit

der Oberphase des Gemisches bei einer Tropfgeschwindigkeit von 10 ml pro 7 Min. entwickelt. Fraktionen zu 20 ml wurden aufgefangen. Die einzelnen Fraktionen wurden durch DC analysiert und entsprechend ihren Inhaltsstoffen vereinigt. Es resultierten insgesamt 7 Hauptfraktionen F_1-F_7 (Tab. VI).

F_1 1-120		nicht weiter untersucht
F_2 125-155	320 mg	U3 (LOKUNDJOSID), chromatographisch rein
F_3 156-209	70 mg	U3 (LOKUNDJOSID) und nicht identifizierte Substanzen
F_4 210-290		mehrere Flecken, nicht weiter untersucht
F_5 325-380		
F_6 395-650	524 mg	Gemisch aus U4 (FAVARGOSID) und U5 (GLUCO-LOKUNDJOSID)
F_7 650-800		U4 (FAVARGOSID), U5 (GLUCO-LOKUNDJOSID) und nicht weiter untersuchte Substanzen

Tabelle VI

Die Fraktion F_2 enthielt U3 (LOKUNDJOSID) in chromatographisch fast reiner Form. Nach Eindampfen wurde der Rückstand aus Aceton kristallisiert und dann nochmals aus Methanol/Äther umkristallisiert. U3: 290 mg weißliche Prismen.

4.2. Isolierung von U2 (16ß-HYDROXY-STROPHANTHIDOL) und U3 (LOKUNDJOSID) aus U4 (FAVARGOSID) und U5 (GLUCO-LOKUNDJOSID)

Der Abdampfrückstand der Mischfraktion F_6 aus U4,U5 (524 mg)

wurde in 200 ml m/15 Phosphatpuffer pH 5.5 aufgenommen, mit 1 g Cellulase und 5 ml Toluol versetzt und 8 Tage lang bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktionsmischung wurde 7mal mit je 100 ml Chloroform/Äthanol 3:1 ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung und anschließend mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum zur Trockne eingeengt. Der Rückstand enthielt laut DC-Prüfung mit den Laufmitteln I und II die Substanzen U2 (16ß-HYDROXY-STROPHANTHIDOL) und U3 (LOKUNDJOSID).

Er wurde erneut an einer Kieselgelsäule (mit einer Anreibung von 100 g Kieselgel mit 10 ml Wasser, Ø 2 cm) mit je 250 ml Chloroform mit steigendem Methanolgehalt (1%, 2%, ... 25%) chromatographiert. Fraktionen zu 10 ml pro 7 Min. wurden aufgefangen. Die laut DC-Prüfung einheitlichen Fraktionen F_{U2} (115-145) und F_{U3} (155-180) wurden vereinigt und im Vakuum zur Trockne eingedampft (siehe Tab. VII).

F_{U2} 115-145	152 mg	U2 (16ß-HYDROXY-STROPHANTHIDOL), chromatographisch rein
F_{U3} 155-180	197 mg	U3 (LOKUNDJOSID), chromatographisch rein

Tabelle VII

Die Substanzen waren in den jeweiligen Fraktionen in chromatographisch fast reiner Form enthalten. Nach Umkristallisieren aus Methanol/Äther fielen 152 mg U2 (16ß-HYDROXY-STROPHANTHIDOL) und 197 mg U3 (LOKUNDJOSID) an.

4.3. Isolierung von U4 (FAVARGOSID) und U5 (GLUCO-LOKUNDJOSID)

Bei einem weiteren Versuch wurde der Abdampfrückstand der Mischfraktion F_6 (543 mg) ohne vorherige enzymatische Spaltung an einer Merck Kieselgelfertigsäule (Größe B, 2.5 cm Ø, Länge 31 cm) mit dem Fließmittel Chloroform/Methanol 95:5 erneut chromatographiert (Tropfgeschwindigkeit 1.5 ml pro min.). Fraktionen zu 10 ml wurden aufgefangen. Die U4 (FAVARGOSID), U4+U5 und U5 (GLUCO-LOKUNDJOSID) enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und im Vakuum zur Trockne eingeengt (siehe Tab. VIII).

F_{U5}	250-380	96 mg	U4 chromatographisch rein
F_{U4+U5}	380-440	322 mg	U4+U5 Mischfraktion
F_{U5}	440-600	79 mg	U5 chromatographisch rein

Tabelle VIII

Es gelang nicht, FAVARGOSID und GLUCO-LOKUNDJOSID zur Kristallisation zu bringen.

4.4. Eigenschaften von U2 (3ß,5ß,14ß,16ß,19-Pentahydroxy-card-20(22)-enolid)

Zusammensetzung : $C_{23}H_{34}O_7$ MG: 422.5

Elementaranalyse: gef.: C 66.19% H 9.14%

ber.: C 65.38% H 8.11% R=7

Schmelzpunkt : 214-218°C (aus MeOH/Äther)

UV-Absorption : λ_{max}=218 nm (1,676 mg/50 ml MeOH)

ε=14500 (lgε=4,16)

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{24}$= + 44.48° (c 0.843; MeOH)

IR-Absorption : (1.23 mg/300 mg KBr)

$[cm^{-1}]$: 362, 440, 482, 525, 560, 650, 698, 750, 775, 840, 856, 894, 927, 976, 1000, 1025, 1043, 1060, 1080, 1111, 1142, 1162, 1200, 1242, 1280, 1295, 1335, 1432, 1445, 1616, 1635, 1752, 1773, 1788, 2885, 2943, 3300, 3460.

^{1}H-NMR-Spektrum : (in d-Pyridin, 100 MHz)

δ= 1.1ppm (s,3H-18);

δ= 2.75ppm ($w_{1/2}$=15 Hz,m, 2H-15);

δ= 3.29ppm (d,1H-17α, J=8 Hz);

δ= 3.89ppm; 4.00ppm; 4.49ppm; 4.60ppm (q,2H-19, J_{AB}=11 Hz,ν_A=454 Hz,ν_B=395 Hz);

δ= 4.37ppm ($w_{1/2}$=7-8 Hz,s, 1H-3α);

δ= 5.01ppm ($w_{1/2}$=10 Hz,dt, 1H-16α);

δ= 5.41ppm; 5.59ppm; 5.63ppm; 5.81ppm (q,2H-21, J_{AB}=18Hz,ν_A=567.3 Hz, ν_B=554.7 Hz);

δ= 6.24ppm (t,1H-22).

Massenspektrum : (EI, 70eV, 190°)

m/e (relative Intensität in %): M^+ = 422 (0,8), 405 (0,5), 404 (1), 387 (1), 386 (4), 375 (2), 374 (8), 369 (4), 368 (12), 357 (8), 356 (66), 353 (6), 350 (11), 338 (13), 335 (9), 332 (7), 323 (4), 320 (6), 319 (7), 314 (4), 307 (3),

305 (6), 296 (8), 260 (5), 253 (5),
247 (8), 245 (6), 235 (5), 233 (6),
231 (6), 229 (19), 217 (12), 199 (13),
187 (13), 180 (45), 179 (47), 176 (55),
160 (37), 159 (47), 145 (34), 143 (32),
141 (24), 131 (53), 129 (45), 127 (24),
119 (36), 117 (50), 115 (58), 105 (50),
91 (92), 77 (62), 63 (42), 53 (26),
51 (53), 43 (100), 39 (87), 32 (95),
31 (32).

4.4.1. Acetylierung von U2 (16ß-HYDROXY-STROPHANTHIDOL)

Für die Acetylierung der Verbindung U2 wurde die ^{1}H-NMR-Lösung in d-Pyridin (ca. 10 mg) mit 0,01 ml Essigsäureanhydrid und 30 mg 4-Pyrrolidinopyridin versetzt und bei Raumtemperatur stehengelassen. Die Acetylierung wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt. Nach 12stündigem Stehen hatte die Ausgangssubstanz sich vollständig umgesetzt. Nach Eingießen in 20 ml Eiswasser wurde mit Äther ausgeschüttelt. Die ätherische Phase wurde bis zur schwach sauren Reaktion mit 2n HCl-Lösung versetzt, mit wenig 5%iger Natriumbicarbonat-Lösung und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeengt. Der Rückstand war noch verunreinigt und wurde auf einer Dickschicht-Fertigplatte durch präparative DC mit Chloroform/Methanol 9:1 als Fließmittel gereinigt.
Die das Penta-O-acetylderivat enthaltende Kieselgelzone wurde mehrmals mit 6 ml Methanol/Chloroform 1:1 eluiert und das Eluat eingeengt. Der Rückstand betrug 6 mg und kristallisierte nicht.

4.4.2. Eigenschaften von U2-Penta-acetat

^{1}H-NMR-Spektrum: (in $CDCl_3$, 90 MHz)

δ = 1.3ppm (s, 3H-18)

δ = 2.03ppm-2.21ppm (15 H, breites Signal mit fünf Spitzen)

δ = 6.03ppm (1H-22)

IR-Absorption : (flüssig, aus NMR-Lsg., Lsgm. $CDCl_3$)

$[cm^{-1}]$: 600, 642, 730, 827, 915, 974, 1018, 1040, 1100, 1170, 1243, 1370, 1437, 1538, 1578, 1630, 1665, 1740, 2870, 2935, 3475.

4.5. Eigenschaften von U4 (3ß,5ß,14ß,16ß,19-Pentahydroxy-card-20(22)-enolid-3-ß-D-glucopyranosid)

Zusammensetzung : $C_{29}H_{44}O_{12}$ MG: 584.663

Schmelzpunkt : 165-175°C amorph

UV-Absorption : λ_{max}=218 nm (5,036 mg/100 ml MeOH

ε=14020 (lgε=4.13)

λ_{max}=265-270 nm, ε=4644 (lgε=3.66)

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{28}$ = + 9.648° (c 0,2073 g/100 ml 80% MeOH)

IR-Absorption : (1.10 mg, 300 mg KBr)

$[cm^{-1}]$: 599, 702, 835, 850, 898, 1035, 1075, 1095, 1160, 1260, 1375, 1446, 1627, 1733, 1780, 2890, 2940, 3340.

^{1}H-NMR-Spektrum : (in d-Pyridin, 100 MHz)

δ = 1.07ppm (s,3H-18);

δ = 1.29ppm (d,1H, von Isopropanol);

δ = 2.74ppm (m,2H-15);

δ = 3.21ppm (d,1H-17α,J_{AB}=8 Hz);

δ = 3.84ppm-454ppm (m,8H,H-2',H-3',H-4',
H-5',H-6',2H-19,H-3α);

δ = 4.90ppm und δ = 4.94ppm (m,7H,1H-16α,1H-1');

δ = 5.30ppm,5.47ppm,5.53ppm,5.71ppm (q,2H-21,
J_{AB}=18 Hz, ν_A=557.8 Hz, ν_B=542.2 Hz);

δ = 6.13ppm (s,1H-22).

4.5.1. Acetylierung von U4 (FAVARGOSID)

20 mg der Verbindung U4 wurden in 1 ml Pyridin gelöst, mit 1 ml wasserfreiem Essigsäureanhydrid versetzt und 24 h bei Raumtemperatur stehengelassen. Laut DC-Prüfung war die Ausgangssubstanz vollständig umgesetzt. Danach wurde das Ganze auf 20 g Eis gegossen und bis zum Auftauen stehengelassen. Die wäßrige Lösung wurde fünfmal mit Äther ausgeschüttelt. Die ätherische Phase wurde bis zur schwach sauren Reaktion mit 0.1 n HCl-Lösung versetzt, mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum bis zur Trockne eingeengt. Es konnten 12 mg reines Hexa-o-acetylderivat erhalten werden, das nicht kristallisierte.

4.5.2. Eigenschaften von U4-Hexa-acetat

^{1}H-NMR-Spektrum : (in $CDCl_3$, 90 MHz)
δ = 1.26ppm (s,3H-18);
δ = 2.0ppm-2.11ppm (18H, breites Signal mit sechs Spitzen);
δ = 5.99ppm (t,1H-22)

Massenspektrum : (EI, 70 eV, 250°)
m/e (relative Intensität): [M^+ = 836], 740 (0.6; M^+-60-2H_2O), 698 (0.8; M^+-2x60-H_2O), 680 (1.5; M^+-2x60-H_2O), 668 (0.6; M^+-4x42), 656 (0.5; M^+-3x60), 638 (0.9; M^+-3x60-H_2O oder M^+-4x42-30), 626 (0.5; M^+-5x42), 596 (0.4; M^+-4x60 oder M^+-5x42-30), 536 (0.3; M^+-5x60), 518 (0.4; M^+-5x60-H_2O), 501 (1.8), 459 (1.1; $M+1^+$-6x60-H_2O), 431 (2.6), 429 (2.3), 410 (4), 392 (9), 350 (16), 331 (42), 320 (11), 317 (9), 289 (18), 271 (25), 229 (43), 226 (41), 211 (19), 200 (9), 187 (13), 169 (100), 157 (19), 145 (24), 139 (11), 127 (20), 115 (24), 109, (53), 103 (14), 98 (23), 60 (100), 43 (100).

IR-Absorption : (flüssig,aus NMR-Lsg.; Lsgm. $CDCl_3$)
[cm^{-1}] : 600, 642, 692, 730, 835, 910, 1040, 1170, 1237, 1370, 1435, 1630, 1740, 2875, 2940, 3540.

Farbreaktionen : mit 84%iger H_2SO_4
0' orangegelb, 1' rotbraun, 5' rotbraun, 30' rotviolett, 1h grünbraun.

4.5.3. Spaltung von U4 (FAVARGOSID) mit Cellulase

10 mg U4 wurden in 3 ml Wasser gelöst, mit 2 mg Cellulase und 1 Tropfen Toluol versetzt und drei Tage bei Raumtemperatur inkubiert.
Anschließend wurde viermal mit wenig Chloroform/Äthanol 3:1 ausgeschüttelt. Die Auszüge, mit wenig Wasser, Sodalösung und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeengt, waren laut DC-Prüfung mit U2 identisch.
Die wäßrige Lösung wurde im Vakuum von den Chloroform/Äthanolresten befreit und chromatographisch analysiert.
Im DC-, PC-Test und durch DS-Elektrophorese wurde der Zucker im direkten Vergleich als D-Glucose identifiziert (siehe Tab. IX).

Adsorbens : I.MN 214
II.Kieselgel F_{254}

Laufmittel: I.Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1
II.Butanol/Toluol/Wasser 4:1:1

Laufzeit : I.45h
II. 5h

Substanz	Rf x 100 I	II	Anilinphthalat (RV) PC 110°C	Thymol/H_2SO_4 (RVI) auf DC 120°C
U4-Zucker	17	20	braun	hellrot
D-Glucose	17	20	braun	hellrot

Tabelle IX

DS-Elektrophorese(46):

Adsorbens : MN-214

Entwicklung : bei 300 V/40mA in einer Borax-Pufferlösung vom pH 10,4±1

Sprühreagenz: Anilinphthalat-Reagenz (RV) mit einigen Tropfen Trichloressigsäure in Alkohol.

D-Glucose und der Zucker von U4 wanderten dabei im Elektropherogramm vom Startpunkt in 3h 9 cm zur Anode.

4.6. Eigenschaften von U3 (3ß,5ß,11α,14ß-Tetrahydroxy-card-20(22)-enolid-3-α-L-rhamnopyranosid)

Zusammensetzung : $C_{29}H_{44}O_{10}$ MG: 552.64

Elementaranalyse: gef.: C 61.44% H 8.02%

ber.: C 63.63% H 8.02%

Schmelzpunkt : 239-242°C (aus Aceton)

252-258°C (aus MeOH/Äther)

UV-Absorption : λ_{max}=218 nm (1.778 mg/50 ml MeOH)

ε=15463 (lgε=4.19)

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20}$= -9.95°C (c 1.1068; 80% MeOH)

IR-Absorption : (1.15 mg, 300 mg KBr)

$[cm^{-1}]$: 376, 425, 475, 543, 580, 620, 701, 800, 833, 855, 883, 900, 953, 988, 1028, 1064, 1090, 1129, 1161, 1227, 1289, 1305, 1340, 1380, 1453, 1620, 1730, 1803, 2880, 2940, 2980, 3260, 3330, 3550.

IR-Überlagerungsspektrum mit authentischem LOKUNDJOSID:

Die IR-Spektren von U3 und LOKUNDJOSID sind deckungsgleich.

Gleiche Werte wie oben angegeben.

^{1}H-NMR-Spektrum : (in Pyridin, 100 MHz)

δ= 1.07ppm (s,3H-18);

δ= 1.25ppm (s,3H-19);

δ= 1.56ppm (d,1H-6', J = 5 Hz);

δ= 2.86ppm (m,1H-17α);

δ= 4.14-4.43ppm (m,6H,H-2',H-3',H-4',H-5', H-3α,H-11ß);

δ= 4.86ppm, 5.04ppm, 5.14ppm, 5.32ppm (q,2H-21, J_{AB}=18Hz, J_{AX}=2Hz, J_{BX}=1Hz, ν_A=520Hz, ν_B=498 Hz);

δ= 5.41ppm (s,1H-1');

δ= 6.04ppm (t,1H-22).

Massenspektrum : (E IV B, 300°) m/e 410-534

m/e (relative Intensität in %): [M^+=552], 534 (0.5), 516 (1), 508, 499, 498 (5), 490 (1), 480 (2), 472, 462, 454 (1), 444, 426, 417 (5);

(E IV B, 230°) m/e 40-407

407 (5), 406 (2), 389 (17), 371 (24), 370 (17), 353 (59), 352 (29), 335 (40), 334 (100, Basis-peak), 319 (10), 316 (12), 309 (7), 290 (10), 284 (12), 242 (9), 227 (10), 224 (10), 217 (19), 199 (48), 173 (28), 157 (31), 147 (57), 145 (52), 133, 128, 117, 102, 91, 85, 73, 60

4.6.1. Spaltung von U3 (LOKUNDJOSID) nach MANNICH und SIEWERT

100 mg U3 wurden in 10 ml Aceton mit 0,1 ml konz. Salzsäure versetzt und 3 1/2 Tage bei Zimmertemperatur stehengelassen. Dann wurde mit 20 ml Wasser versetzt, das Aceton im Vakuum entfernt und die wäßrige Lösung 30 Minuten auf 70°C erwärmt. Anschließend wurde 10mal mit je 10 ml Chloroform/Äthanol 2:1 ausgeschüttelt. Waschen der organischen Phase mit wenig Wasser, Sodalösung und Wasser, Trocknen über Natriumsulfat und Eindampfen im Vakuum ergaben 71 mg Rohprodukt, das laut DC-Prüfung 3 Substanzen enthielt und erneut an 12 g Kieselgel chromatographiert wurde.
Es wurde mit je 50 ml Chloroform mit steigendem Methanolgehalt eluiert und Fraktionen zu 10 ml pro 7 min. gesammelt.
Die den Hauptfleck enthaltenden Fraktionen 34-41 (28 mg) ergaben nach Umkristallisation aus Methanol/Äther 12 mg farblose Prismen U1. DC-Vergleich von U1 mit authentischem BIPINDOGENIN zeigte gleiche Rf-Werte (siehe Tab. X).

Adsorbens : Kieselgel F_{254}
Laufmittel: I.Butanol/Toluol/Wasser 4:1:1
II.Chloroform/Methanol 7:3

Substanz	Rf x 100 I	II	Vanillin/H_2SO_4 (RIV) 120°C auf DC
U1	46	60	blau
Bipindogenin	46	60	blau

Tabelle X

Die wäßrige Lösung und die ersten Waschwasser wurden vereinigt, im Vakuum von Chloroform/Äthanol-Resten befreit und mit einem

Anionenaustauscher (OH-Form) neutralisiert.
Im PC-, DC-Test und durch DS-Elektrophorese wurde der Zucker im direkten Vergleich als L-Rhamnose identifiziert (Tab. XI, Ausführungen siehe 4.5.3):

Substanz	Rf x 100 I	Rf x 100 II	Anilinphthalat 110°C auf PC (R V)	Thymol/H_2SO_4 120°C auf DC (R VI)
U3-Zucker	39	35	braun/UV-Fluoreszenz	hellrot
L-Rhamnose	39	35	braun/UV-Fluoreszenz	hellrot

Tabelle XI

L-Rhamnose und der Zucker von U3 wanderten dabei im Elektropherogramm vom Startpunkt in 3h 5 cm zur Anode.

4.6.2. Eigenschaften von U1 (3ß,5ß,11α,14ß-Tetrahydroxy-card-20(22)-enolid

Zusammensetzung : $C_{23}H_{34}O_6$ MG: 406.5
Schmelzpunkt : 238-243°C (aus MeOH/Äther)
Mischschmelzpunkt: U1 ergab mit authentischem BIPINDOGENIN keine Schmelzpunkterniedrigung.
Massenspektrum : (EI, 70 ev, 200°C)
m/e: M^+ = 406 (1), 389 (2), 388 (5), 371 (6), 370 (23), 353 (15), 352 (54), 337 (13), 335 (26), 334 (100), 319 (16), 316 (18), 260 (4), 242 (9), 227 (7), 224 (9), 217 (17), 209 (11), 200 (13), 199 (42), 181 (11), 165 (24), 152 (26), 145 (26), 143 (20), 131 (20), 129 (20), 128 (26), 119 (26), 115 (34), 111 (24), 107

(20), 105 (36), 93 (20), 91 (42), 81 (18), 79 (30), 77 (39), 65 (24), 63 (22), 55 (14), 51 (28), 50 (22), 43 (46), 41 (27), 39 (42), 37 (16), 32 (100), 31 (18).

4.6.3. Massenspektrum von BIPINDOGENIN ergab Bruchstücke derselben Massenzahlen: (EI, 70 ev, 190°C)

m/e: M^+ = 406 (1), 389 (1), 388 (4), 371 (2), 370 (6), 353 (2), 352 (6), 337 (4), 335 (19), 334 (87), 319 (2), 316 (8), 260 (3), 242 (4), 227 (4), 223 (3), 217 (16), 209 (4), 207 (5), 200 (13), 199 (46), 181 (6), 180 (11), 165 (19), 152 (22), 145 (13), 143 (13), 141 (12), 131 (12), 129 (16), 128 (18), 119 (13), 115 (29), 111 (13), 109 (17), 107 (14), 105 (24), 93 (17), 91 (36), 89 (12), 81 (18), 79 (29), 77 (43), 67 (19), 65 (24), 63 (23), 62 (17), 55 (16), 53 (18), 52 (12), 51 (30), 50 (35), 44 (22), 43 (99), 41 (29), 40 (77), 39 (58), 37 (33), 36 (20), 32 (100).

4.7. Eigenschaften von U5 (3ß,5ß,11 ,14ß-Tetrahydroxy-card-20 (22)-enolid-3ß-O-[O-ß-D-glucopyranosyl-(1 → 4)]-α-L-rhamnopyranosid)

Zusammensetzung : $C_{35}H_{54}O_{15}$ MG: 714.808
Schmelzpunkt : 155°C Blasen, 220°C-225°C (bräunlichrot gefärbt)
UV-Absorption : λ_{max} = 215nm (1.812 mg/100 ml MeOH)

ε = 14045 (lgε = 4.15)

IR-Absorption : (1.50 mg, 300 mg KBr)

$[cm^{-1}]$: 536, 573, 630, 802, 835, 900, 931, 982, 1035, 1073, 1163, 1385, 1450, 1625, 1735, 2875, 2934, 3400.

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{28}$ = -2.4°C (0.2085 g/100 ml 80% MeOH)

4.7.1. Spaltung der Substanz U5 (GLUCO-LOKUNDJOSID)

20 mg U5 wurden wie unter 4.6.1. beschrieben nach MANNICH und SIEWERT (75) vollständig (DC-Test) gespalten. Substanz U1 (BI-PINDOGENIN) wurde wie üblich durch Ausschütteln abgetrennt. Die verbleibende wäßrige Phase wurde im Vakuum eingeengt, und der Rückstand an Cellulose (MN 2200, Produkt der Firma Machery und Nagel) chromatographiert. Dafür wurden 10 g Cellulose über Nacht in 10 ml Aceton aufgeschwemmt, auf eine Säule (Ø 1 cm) gebracht und solange mit Butanol/Äthanol/Wasser 4:1:1 gewaschen, bis mit Raymond-Reagenz (RII) kein Aceton mehr nachzuweisen war.
Es wurde mit Butanol/Äthanol/Wasser 4:1:1 chromatographiert, und es wurden Fraktionen zu 2 ml aufgefangen. Die einzelnen Fraktionen wurden dc und pc auf Zucker geprüft (Tab. XII).

Fraktionen	1 - 12	verworfen
Fraktionen	17 - 33	Z1 (L-Rhamnose)
Fraktionen	34 - 44	verworfen
Fraktionen	45 - 54	Z2 (D-Glucose)

Tabelle XII

Der Rückstand aus Fraktion 17-33 war mit L-Rhamnose (PC-,DC-Test,

DS-Elektrophorese und Farbreaktionen) identisch, der Rückstand aus Fraktion 45-54 mit D-Glucose (PC-, DC-, enzymatischer Test (Glucosidase), DS-Elektrophorese und Farbreaktionen).
Ausführungen, Rf-Werte und Farbreaktionen siehe 4.5.3. und 4.6.1..

VII. DISKUSSION

Schon frühere Untersuchungen hatten ergeben, daß ERYSIMUM DECUMBENS Dennst. zwei vorher in dieser Gattung nicht beobachtete Glucosinolate enthält.

Die nun vorliegenden neuen Ergebnisse zeigen, daß sich ERYSIMUM DECUMBENS Dennst. deutlich von den übrigen ERYSIMUM-Arten hinsichtlich der Cardenolide unterscheidet. Im Gegensatz zu den untersuchten ERYSIMUM-Arten Mittel- und Osteuropas, die durchweg HELVETICOSID und ERYSIMOSID sowie zusätzliche -STROPHANTHIDIN- oder STROPHANTHIDOL-Glykoside - oft auch Glykoside von UZARIGENIN, CANNOGENIN und CANNOGENOL - enthalten, weist die im Schweizer und Französischen Jura vorkommende Art ERYSIMUM DECUMBENS Dennst. Cardenolid-Glykoside auf, die sich von BIPINDOGENIN und 16ß-HYDROXY-STROPHANTHIDOL ableiten - also von zwei hydroxylierten Derivaten des PERIPLOGENINS und STROPHANTHIDOLS. Eines der Cardenolid-Glykoside von ERYSIMUM DECUMBENS Dennst. - LOKUNDJOSID - kommt in Strophanthus- und Convallaria-Arten, aber auch in der ERYSIMUM-Art ERYSIMUM CUSPIDATUM DC (M.B.) vor. Weitere BIPINDOGENIN-Glykoside waren auch in ERYSIMUM x MARSHALLI (Stark ex Moore) und in ERYSIMUM SUFFRUTICOSUM Spr. beschrieben.

GLUCO-LOKUNDJOSID, das möglicherweise auch in Strophanthus- und Convallaria-Arten genuin vorkommt, wurde als solches erstmals aus ERYSIMUM DECUMBENS Dennst. isoliert und näher charakterisiert.

Ein weiteres neues Cardenolid-Glukosid ist das aus ERYSIMUM DECUMBENS Dennst. isolierte 16ß-HYDROXY-STROPHANTHIDOL-Glykosid, das nach dem schweizer Erysimum-Spezialisten FAVARGER als

FAVARGOSID (Aglykon: FAVARGOGENIN) benannt wird. Weder FAVARGOSID noch sein Aglykon FAVARGOGENIN sind bisher im Pflanzenreich angetroffen worden.

Das Vorkommen von BIPINDOGENIN- und FAVARGOGENIN-Glykosiden in ERYSIMUM DECUMBENS Dennst. läßt erkennen, daß im Gegensatz zu sonstigen ERYSIMUM-Arten hier die Biosynthese weiterläuft, d.h. die intermediär gebildeten PERIPLOGENIN- und STROPHANTHIDOL-Glykoside werden - einmal in 11α-Stellung, zum anderen in 16ß-Stellung - durch entsprechende Enzymsysteme hydroxyliert. Solche hydroxylierenden Enzyme, die heute vor allem in der Steroid-Synthese eine wichtige Rolle spielen, wurden in Schimmelpilzen beobachtet, in denen sie in großer Variationsbreite vorkommen. Möglicherweise bieten Frischpflanzen von ERYSIMUM DECUMBENS Dennst. oder Gewebekulturen davon Ausgangsmaterial für die Gewinnung zweier spezifisch hydroxylierender Enzyme.

Aufgrund der vorkommenden Glucosinolate und Cardenolide ist ERYSIMUM DECUMBENS Dennst. zwar ein typischer Vertreter der Gattung ERYSIMUM, gleichzeitig aber auch aufgrund der fehlenden STROPHANTHIDIN- und UZARIGENIN-Glykoside ein Sonderfall unter den ERYSIMUM-Arten.

VIII. ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Art ERYSIMUM DECUMBENS Dennst. wurde in einer Einleitung botanisch beschrieben, und ihre Stellung innerhalb der Gattung, wie sie heute nach den Arbeiten FAVARGERS Gültigkeit hat, erläutert.
2. Es folgt eine allgemeine Übersicht über die bisher bekannten Inhaltsstoffe der Gattung ERYSIMUM: Glucosinolate und Cardenolid-Glykoside.
3. Die Aufgabe der Arbeit bestand in der Isolierung der zwei nachgewiesenen Glucosinolate - GLUCOIBERIN und GLUCOIBERVIRIN -, vor allem aber in der Isolierung und Charakterisierung von drei durch DC in den Samen von ERYSIMUM DECUMBENS Dennst. nachgewiesenen Cardenolid-Glykosiden.
   Von den beiden Glucosinolaten konnte aus den Samen lediglich GLUCOIBERIN kristallin erhalten werden. Das zweite Glucosinolat, GLUCOIBERVIRIN, konnte nach enzymatischer Spaltung durch Myrosinase über das Derivat 3-Methylthiopropylthioharnstoff nachgewiesen und charakterisiert werden.
4. Nach Abtrennung der Glucosinolate aus dem Extrakt von ERYSIMUM DECUMBENS-Samen durch Anionenaustauscher-Harze wurden drei Cardenolid-Glykoside ausgeschüttelt und angereichert. Das Cardenolid-Gemisch wurde in üblicher Weise durch präparative Chromatographie an Kieselgel aufgetrennt.
   Eine als U3 bezeichnete Substanz erwies sich als identisch mit LOKUNDJOSID und ergab nach Hydrolyse RHAMNOSE und BIPINDOGENIN.
   Eine als U5 bezeichnete Substanz wurde amorph erhalten. Sie ergab nach enzymatischer Spaltung mit einer ß-Glucosidase

LOKUNDJOSID und GLUCOSE als Spaltprodukte. U5 ist somit identisch mit GLUCO-LOKUNDJOSID, einem bisher in der Literatur noch nicht beschriebenen Cardenolid-Glykosid.
Als ebenfalls neues Cardenolid-Glykosid erwies sich die Substanz U4. Sie wurde nach Prof. FAVARGER, einem schweizer Botaniker in Neuchâtel, als FAVARGOSID benannt. Bei der enzymatischen Spaltung durch ß-Glucosidase ergab FAVARGOSID neben GLUCOSE ein bisher unbekanntes Cardenolid-Aglykon - 16ß-HYDROXY-STROPHANTHIDOL (FAVARGOGENIN) - dessen Struktur vor allem durch NMR-Spektrometrie sichergestellt wurde.

5. In einer Diskussion wurde die Sonderstellung von ERYSIMUM DECUMBENS Dennst. innerhalb der vielbearbeiteten Gattung ERYSIMUM hervorgehoben, wobei vor allem des Fehlen der in allen bisher untersuchten ERYSIMUM-Arten auftretenden Cardenolid-Glykoside HELVETICOSID und ERYSIMOSID auffallend war.

IX. LITERATURVERZEICHNIS

(1) ABUBAKIROV,N.K. (1971)
Chem. Nat. Comp. 7, 537-52

(2) BALL,P.W. (1964)
Flora Europaea 1, 270-74

(3) BAUER,S., MASLER,L., SIKL,D. and BAUEROVA,O (1966,1962)
Tetrahedron Lett. 1703, Exper. 18, 441

(4) BENNETT,R.D., SAUER,H.H. und HEFTMANN,E. (1968)
Phytochemistry 7, 41

(5) BEZRUK,P.I. (1953)
Farmakol. i Toksikol. 16 No.5, 43-6

(6) BHACCA,N.S. and WILLIAMS,D.H. (1964)
Applications of NMR Spectroscopy in organic chemistry, San Francisco, Holden-Day

(7) BORKOWSKI,A. (1967) Patent-Pol 54, 196 CA 71: 6530 k

(8) BORKOWSKI,B. et al. (1965)
Pol. 50, 185 CA 66: 5749 v

(9) BROWN,P., BRÜSCHWEILER,F. und PETTIT,G.R. (1972)
Helv. Chim. Acta 55, 531-43

(10) BUDZIKIEWICZ,H., DJERASSI,C. and WILLIAMS,D.D. (1964)
Structure elucidation of natural products by mass spectrometry Vol. II, 106, San Francisco, Holden-Day

(11) CASPI,E. und HORNBY,G.M. (1968)
Phytochemistry 7, 423

(12) CASPI,E., LEVIS,D.O., PIATAK,D.M., THIMANN,K.V. und WINTER,A. (1966)
Exper. 22, 8, 506

(13) CASPI,E. und LEVIS,D.O. (1968)
Phytochemistry 7, 683

(14) CRONQUIST (1968)
The Evolution and Classification of Flowering Plants, Thomas Nelson Ltd., London and Edinburgh

(15) DIMOR,Khr. and BOYADZHIEVA,M. (1974)
Dokl. Bolg. Akad. Nauk. 27, 1101-3

(16) EMSLEY,J.W., FEENEY,J. and SUTCLIFFE,L.H. (1966)
High Resolution NMR Spectroscopy I, 357 ff,
Pergamon Press

(17) ENGLER,A. (1964)
Syllabus der Pflanzenfamilien II, Berlin

(18) ETTLINGER,M.G. and DATEO,G.P. (1961)
Final Report Contract DA 19-129-QM-1059,
Natick, Mass

(19) ETTLINGER,M.G. and KJAER,A. (1968)
in: Recent Advances of Phytochemistry (edit.
by MABRY,T.Y., ALSTON,R.E. and RUNECKLES,V.C.)
Vol. I, 58-144, Appleton-Century-Crofts,
New York

(20) ETTLINGER,M.G. and LUNDEEN,A.I. (1956,1957)
Amer. Chem. Soc. 78, 4127, ibid. 79, 1764

(21) EUW,J.V. und REICHSTEIN,T. (1964)
Helv. Chim. Acta 47, 711-24

(22) FAVARGER,C. (1964)
Bull. Soc. bot. Suisse 74, 5-40
Recherches cytotaxonomiques sur quelques
Erysimum

(23) FAYEZ,M.B.E. and NEGM,S.A.R. (1968)
Chem. Ind.. London 40, 1361-62

(24) FAYEZ,M.B.E. and NEGM,S.A.R. (1972)
J. Pharm. Sci. 61(5), 765-69

(25) FECHTIG,B. SCHINDLER,O. und REICHSTEIN,T. (1960)
Helv. Chim. Acta 43, 727

(26) FEOFILAKTOV,V.V. und TSAREV,M.V. (1946)
Farmatsiya 4, 8

(27) FEOFILAKTOV,V.V. und VILAR,Tr. (1950)
Farmatsiya 10, 44

(28) FROHNE,D. und JENSEN,U. (1973)
Systematik des Pflanzenreichs, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

(29) GENKINA,G.L. TURAKHOZHAEV,M.T., SHAMSUTDINOV,R.I. und SHAKIROV,T.T.
Khim. Prirodn. Soedin. 1974

(30) GHEORGHIN,A. und I-MATIN,E. (1961)
An. Fac. Farm. 19, 277-282 CA 56: 1528 e

(31) GIBBS,R.D. (1974)
Chemotaxonomy of Flowering Plants, Vol. III, 1516, Montreal and London

(32) GMELIN,R. (1954), Diss., Tübingen

(33) GMELIN,R. (1966)
Ger. 1, 221, 764, Appl. May 25, 1965

(34) GMELIN,R. und BREDENBERG,J.B.von (1966)
Arzneimittelforsch. 16, 123

(35) GMELIN,R. and KJAER,A. (1969)
Acta Chem. Scan. 23, 2548-9

(36) GMELIN,R. KJAER,A. and SCHUSTER,A. (1968)
Acta Chem. Scan. 22, 2875

(37) GREGORY,H. and LEETE,E. (1960)
Chem. & Ind. 1242

(38) GÜNTHER,H. (1973)
NMR-Spektroskopie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S. 112

(39) HEGI, (1958-1963)
Illustrierte Flora von Mittel-Europa IV, 1, 2. Aufl.

(40) HEGNAUER,R. (1964)
Chemotaxonomie der Pflanzen, Bd. III, 586-601, Birkhäuser Verlag, Basel und Stuttgart

(41) HEYNS,K. und MÜLLER,D. (1966)
Tetrahedron Letters 48, 6061

(42) HÖFLE,G. und STEGLICH,W. (1972)
Synthesis 11, 619-21

(43) ISAEV,Iv. und LIBIZOV,N. (1963)
Farmatsiya 13, 33-38

(44) JARETZKY,R. und WILKE,M. (1932)
Arch. Pharmac. 270, 81

(45) KASUMOV,M.A. et al. (1957)
Uchenye Zapiski Azerbaidzhan. Gosudarst.
Univ. im. M.S. Kirova no. 4, 83-4 CA 53: 9574

(46) KAUFMANN,H., MÜHLRADT,P. und REICHSTEIN,T. (1967)
Helv. Chim. Acta 50, 2287

(47) KEDDE,D.L. (1947) und LEWBART,M.L., WEHRLI,W. und REICHSTEIN,T. (1963)
Pharm. Weekbl. 82, 741
Helv. Chim. Acta 46, 505

(48) KJAER,A., CONTI,I. and LARSEN,I. (1953)
Acta Chem. Scan. 7, 1271

(49) KJAER,A. and GMELIN,R. (1957)
Acta Chem. Scan. 11, 577

(50) KJAER,A. and SCHUSTER,A. (1970)
Acta Chem. Scan. 24, 1631

(51) KJAER,A. and SCHUSTER,A. (1973)
Phytochemistry 12, 929

(52) KOLESNIKOV,D.G. and MAKSYUTINA,N.P. (1957)
Med. Prom. SSSR 9, 14

(53) KORBAR-SMID,J. (1966)
Farm. Vestnik LJUBLJANA 17 (9-12), 205-17
CA 66: 83059 (1967)

(54) KOWALEWSKI,Z. (1960)
Helv. Chim. Acta 43, 1314-21

(55) KOWALEWSKI,Z., JÄGER,H. und SCHINDLER,O. (1960)
Helv. Chim. Acta 43, 957-972, 1280-1290

(56) LI-JUNG-LUNG and LOSHKAREV,P.M. (1962,1969)
Med. Prom. SSSR 4, 11, ibid. 7, 18

(57) LOSHKAREV,P.M. (1955)
Aptechnoe Delo 4 (5), 20-22

(58) LOSHKAREV,P.M. and FEOFILAKTOV,V.V. (1959)
Trudy Vvesoynz. Nauch.-Issledovatel. Inst. Lekarstrennykh i Aromaticheskikh Rastenii 11, 157-168

(59) MAKAREVICH,I.F. and ZOZ.I.G. (1964)
Med. Prom. SSSR 5, 19

(60) MAKAREVICH,I.F. (1965), Chem. Nat. Comp. 1, 67-69
(1965) ibid. 1, 123
(1969) ibid. 5, 163-64

(61) MAKAREVICH,I.F. and KOLESNIKOV,D.G. (1969)
Chem. Nat. Comp. 5, 164-165

(62) MAKAREVICH,I.F. (1970) Chem. Nat. Comp. 6, 331
(1970) ibid. 6, 582
(1970) ibid. 7, 36
(1972) ibid. 8, 191-95

(63) MAKAREVICH,I.F. (1972)
Postep Dziedzinie Leku Rosl. Pr. Ref. Dosw. Wygloszone Symp. 1970, 57-66 CA 78: 108229

(64) MAKAREVICH,I.F. (1974)
Khim. Prirodn. Soedin. 10, 178-83, 738-41

(65) MAKAREVICH,I.F. und ABUBAKIROV,N.K. (1962)
Zh. Obshch. Khim. 32, 2372

(66) MAKAREVICH,I.F., KLIMENKO,O.J. and KOLESNIKOV,D.G. (1969)
Chem. Nat. Comp. 5, 162

(67) MAKAREVICH,I.F., KLIMENKO,O.J. and KOLESNIKOV,D.G. (1974)
Khim. Prirodn. Soedin. 5, 611-14

(68) MAKAREVICH,I.F. and KOLESNIKOV,D.G. (1965)
Chem. Nat. Comp. 1, 286-87

(69) MAKAREVICH,I.F., KOLESNIKOV,D.G. and BELOKONA,W.F. (1974)
Khim. Prirodn. Soedin. 5, 607-11

(70) MAKAREVICH,I.F. and KOVALEV,I. (1968)
Chem. Nat. Comp. 4 (1), 6-9

(71) MAKAREVICH,I.F., TROPP,M.Ya. und KOLESNIKOV,D.G. (1962)
Dokl. Akad. Nauk. SSSR 147, 849 CA 59: 6506

(72) MAKSYUTINA,N.P. und KOLESNIKOV,D.G. (1954)
Dokl. Akad. Nauk. SSSR 95, 127

(73) MAKSYUTINA,N.P. (1963)
Dokl. Akad. Nauk. SSSR 150, 180

(74) MAKSYUTINA,N.P. (1965)
Chem. Nat. Comp. 1 (4), 228

(75) MANNICH,C. und SIEWERT,G. (1942)
Chem. Ber. 75, 737

(76) MASLENNIKOVA,V.A., KHRISTULAS,F.S. und ABUBAKIROV,N.K. (1959,1961)
Dokl. Akad. Nauk. SSSR 124, 822
Zh. Obshch. Khim. 31, 2069

(77) MASLENNIKOVA,V.A., GENKINA,G.L., UMAROVA,R.U., NAVRUZOVA, A.M. and ABUBAKIROV,N.K. (1967)
Chem. Nat. Comp. 3, 143

(78) METZ,H. (1961)
Naturwissenschaften 48, 569

(79) MOORE,J.A., TAMM,Ch. und REICHSTEIN,T. (1954)
Helv. Chim. Acta 37, 755

(80) NAGATA,W., TAMM,Ch. und REICHSTEIN,T. (1957)
Helv. Chim. Acta 40, 41, Festschrift für Arthur Stoo, Basel (1957), 715

(81) NAVRUZOVA,A.M., MASLENNIKOVA,V.A. and ABUBAKIROV,N.K. (1974)
Chem. Nat. Comp. 7 (6), 828

(82) NOVER,L. (1967)
Arch. Pharm. Ber. Deut. Pharm. Ges. 300 (12), 1022-26

(83) PARTRIDGE,S.M. (1949)
Nature 164, 443

PESCHKE,W. (1965)
J. Chromatog. 20, 572

(84) POLATSCHEK,A. (1966)
Sonderabdruck aus der Österreichischen Botanischen Zeitschrift Bd. 113, H.1

(85) POLONIA,J. (1961)
An. Fac. Farm. Porto 21, 37-43 CA 58: 8231 f

(86) POLONIA,J., ARAUJO,M.H. und POLONIA,M.A. (1966)
An. Fac. Farm. Porto 26, 83-108

(87) RAMSTAD,E. and BEAL,J.L. (1960)
Chem. & Ind. 177

(88) RASHKES,Ya.V., GOROVITS,M.B., MAKARICHEV,G.K. und ABUBAKIROV,N.K. (1971)
Khim. Prirodn. Soedin. 6, 747-58

(89) REICHSTEIN,T. (1962)
Angewandte Chemie 22, 887-94

(90) REICHSTEIN,T. (1967)
Die Naturwissenschaften 3, 54, 53-67

(91) REVERDATTO,V.V. (1943)
Dokl. Akad. Nauk. SSSR 40, 283

(92) SCHNEIDER,W. (1910)
Liebigs Ann. Chem. 375, 207

(93) SCHNEIDER,W. und KAUFMANN,H. (1912)
Liebigs Ann. Chem. 392, 1

(94) SCHULTZ,O.E. und GMELIN,R. (1952)
Z. Naturforsch. 7b, 500

(95) SCHULTZ,O.E. und GMELIN,R. (1953)
Z. Naturforsch. 8b, 151

(96) SCHULTZ,O.E. und WAGNER,W. (1956)
Z. Naturforsch. 11b, 73

(97) SCHWARZ,H. et al. (1946)
Pharm. Acta Helv. 21, 250

(98) SHAH,N.M., MEYER,K. und REICHSTEIN,T. (1949)
Pharm. Acta Helv. 24, 144

(99) SHARIPOV,A.Kh., GOROVITS,M.B., MAKARICHEV,G.K., YAGUDAEV,M.R. and ABUBAKIROV,N.K. (1969)
Chem. Nat. Comp. 5, 228-30

(100) SHASS,E.Yu. und VARLAKOV,M.N. (1941)
Farmatsiya 4, no. 8,7

(101) SINGH,Bh. and RASTOGI,R.P. (1970)
Phytochemistry 9, 315-31

(102) SPITELLER,G. (1963)
Z. Analyt. Chem. 197, 1

(103) STAHL,E. (1967)
Dünnschichtchromatographie, Springer Verlag Berlin

(104) TAKHTAJAN,A. (1969)
Flowering Plants, Origin and Dispersal, Edinburgh

(105) TSCHESCHE,R. (1955)
Fortschr. chem. organ. Naturstoffe 12, 131

(106) TSCHESCHE,R., BECKER,R. und HOMBACH,R. (1968)
Z. Naturforsch. 23b, 1615

(107) TSCHESCHE,R., HOMBACH,R., SCHOLTEN,H. and PETERS,M. (1970)
Phytochemistry 9, 1505-15

(108) TSCHESCHE,R., HULPKE,H. und SCHOLTEN,H. (1967)
Z. Naturforsch. 22b, 677-78

(109) TSCHESCHE,R. und LILIENWEISS,G. (1964)
Z. Naturforsch. 19b, 265-66

(110) TORI,K. and AONO,K. (1965)
Ann. Rept. Shionogi Res. Lab. 15, 130-37 , s.(118)

(111) TUIHAK,E., VAGUJFALVI,D. und HAGONY,P.L. (1963)
J. Chromatog. 11, 45

(112) TURAKHOZHAEV,M.T. et al. (1970)
Chem. Nat. Comp. 6 (1), 137

(113) TURSUNOVA,R.N. und ABUBAKIROV,N.K. (1963,1964)
Dokl. Akad. Nauk. SSSR 19, 45 CA 59: 173
Zh. Obshch. Khim. 34, 2449 CA 61: 10766

(114) UMAROVA,R.U., MASLENNIKOVA,V.A. and ABUBAKIROV,N.K. (1974)
Chem. Nat. Comp. 7 (6), 736-39

(115) VOROBEV,N.E. und DZYUBY,N.P. (1971)
Farmatsiya (Moscow) 20 (3), 22-25

(116) WAGNER,W. (1956) Diss. Tübingen

(117) WILLIAMS,D.H. und FLEMING,J. (1971)
Spektroskopische Methoden in der organ. Chemie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart

(118) ZÜRCHER,R.F. (1961,1963)
Helv. Chim. Acta 44, 1380, ibid. 46, 2054

(119) INCH,T.D. (1969)
Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in the Study of Carbohydrates and Related Compounds
in Annual Review of NMR Spectroscopy
ed. by E.F. Mooney, Vol. 2
Academic Press London, New York

X L E B E N S L A U F

Am 29. Dezember 1945 wurde ich als zweites Kind des Dipl. Ing. Hans Brambach und seiner Ehefrau Eva, geb. Krause, in Neuenschleuse/Kreis Stade geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule in Borstel und später in Erlangen von 1952 bis 1956 besuchte ich ab Herbst 1956 das humanistische Gymnasium Fridericianum in Erlangen, an dem ich im Juli 1965 das Abitur bestand. Vom 1. Oktober 1965 bis 30. September 1967 war ich Praktikant in der Heimstätten-Apotheke in Darmstadt und bestand im September 1967 die Pharmazeutische Vorprüfung.

Zum Sommersemester 1968 begann ich das Studium der Pharmazie an der Freien Universität Berlin, das ich im April 1971 mit dem Staatsexamen beendete.

Seit Januar 1972 beschäftige ich mich mit der vorliegenden Arbeit unter Leitung von Herrn Professor Dr. R. Gmelin am Institut für Pharmakognosie und Phytochemie. Während dieser Zeit erhielt ich zunächst ein Stipendium nach dem Graduierten-Förderungsgesetz, danach arbeitete ich als Lehrer der PTA-Abteilung des Lette-Vereins.

difo-druck · 8600 bamberg
untere königstraße 30